

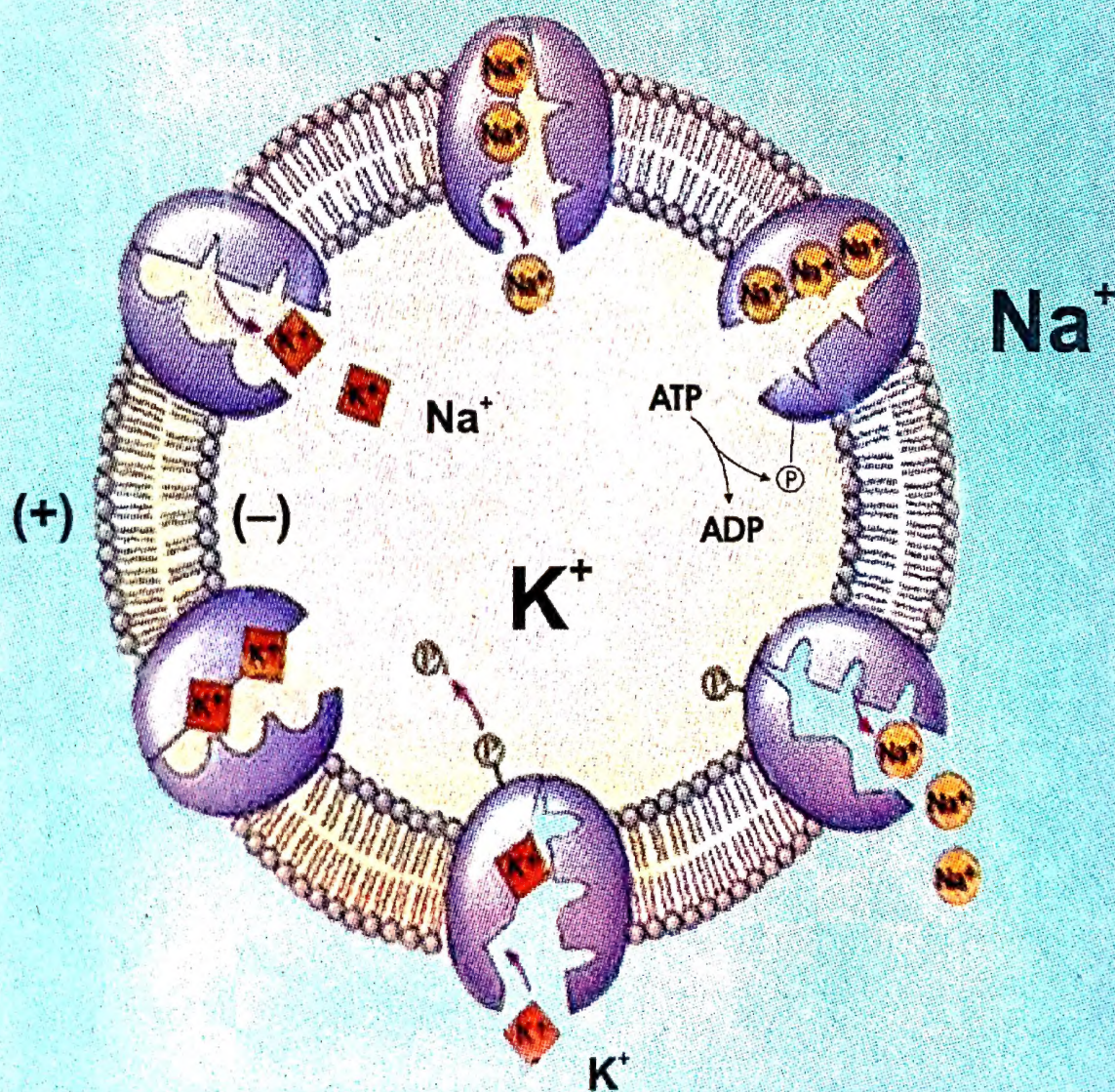
Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ

Rodica Maria ISAC

Florin TOPOLICEANU

Dorina E. CREANGĂ

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARĂ



Editura "APOLLONIA" – Iași – 2002

Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ

Rodica M. Isac Florin Topoliceanu Dorina E. Creangă

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARĂ

*Prei Alexandru Lucian Popescu, cu
simptomele din partea autismului,
Isc*

20 oct. 2007

ISBN 973-9333-38-9



Editura Apollonia
Iași – 2002

CUPRINS

Cuvânt înainte

Prefață

CAPITOLUL 1

Apa biostructurală și interacțiuni moleculare	13
1.1. Structura și proprietățile apei	14
1.2. Principalele compartimente lichidiene din organism	18
1.3. Interacțiuni intermoleculare	20

CAPITOLUL 2

Lipidele și proprietățile lor fizico-chimice	24
2.1. Structura lipidelor și interacțiunile lor intermoleculare	25
2.2. Organizarea sistemelor lipide-apă	27
2.3. Teaca de mielină a axonului neuronal	29

CAPITOLUL 3

Proteine, interacțiuni moleculare și proteine enzimatice catalitice	34
3.1. Legătura peptidică	34
3.2. Proprietățile semiconductoare ale proteinelor	37
3.3. Proprietăți enzimatic	41
3.4. Proprietățile structurale și de medatori ai reacțiilor autoimune	44

CAPITOLUL 4

Proteinele contractile	48
-------------------------------	-----------

CAPITOLUL 5

Elemente de biofizica hemoglobinei	54
5.1. Structura și funcțiile hemoglobinei	55

CAPITOLUL 6	
Molecule macroergice	65
CAPITOLUL 7	
Enzimele lanțului respirator	69
CAPITOLUL 8	
Modelarea matematică a proceselor enzimatiche	79
CAPITOLUL 9	
Acizii nucleici și interacțiunile intermoleculare	92
CAPITOLUL 10	
Elemente de biofizica membranelor celulare	97
10.1. Structura membranei celulare	97
10.2. Proteine canal și canale ionice	103
10.2.1. <i>Tipuri de canale ionice</i>	104
10.3. Permeabilitatea și transportul transmembranar	112
10.4. Transportul pasiv	115
10.4.1. <i>Difuzia simplă</i>	115
10.4.2. <i>Difuzia facilitată</i>	120
10.5. Transportul activ	125
10.5.1. <i>Tipuri de transport activ</i>	125
10.5.2. <i>Pompele ionice</i>	127
10.6. Ecuații diferențiale pentru descrierea cantitativă a bilanțului transportului activ și pasiv	130
10.7. Structurile membranare semipermeabile și percolare	137
CAPITOLUL 11	
Biofizica bioelectrogeneriei celulare	140
11.1. Modele electrice pentru membrana excitabilă	142
11.2. Potențialul de difuzie	145
11.3. Echilibrul Donnan	151



11.4. Potențialul de acțiune neuronal	153
11.4.1. <i>Propagarea potențialului de acțiune</i>	158
11.5. Fluxuri ionice și electrogeneză în fibra musculară	166
11.5.1. <i>Potențialul de acțiune în fibra musculară cardiacă și netedă</i>	166

CAPITOLUL 12

Elemente biofizice de interacțiune și comunicare celulară	174
12.1. Semnalizarea intercelulară: hormoni și proteine receptoare	174
12.1.1. <i>Ionii de calciu - mesageri secundari</i>	182
12.1.2. <i>Dinamica receptorilor</i>	184
12.1.3. <i>Cinetica interacțiunii ligand – receptor</i>	185
12.2. Interacțiuni antigen – anticorp	188
12.2.1. <i>Antigenii</i>	189
12.2.2. <i>Anticorpii</i>	190
12.2.3. <i>Natura forțelor implicate în interacțiunile elementare antigen – anticorp</i>	194
12.2.4. <i>Reacțiile secundare</i>	195
12.2.5. <i>Cinetica formării imunocomplexului antigen-anticorp</i>	196
12.2.6. <i>Cinetica desfacerii complexului imunologic</i>	199
12.2.7. <i>Determinarea constantei de echilibru a procesului imunologic pe baza difuziei prin membrana dializantă</i>	201

CAPITOLUL 13

Elemente de biofizică eritrocitară și hemoreologie	206
13.1. Modelul structural și modelul fizic al membranei eritrocitare	206
13.2. Proprietăți plasto-vâsco-elastice și reologice ale sângelui	215

13.3. Legea lui Bernoulli și numărul lui Reynolds pentru curgerea sangvină	217
13.4. Semnificația fizică a presiunii hidrostatice a sângelui. Tensiunea arterială	220
13.5. Proprietăți reologice ale pereților vaselor sangvine	222
13.6. Anastomoza artero-venoasă	223
13.7. Elasticitatea și histerezis	224
13.8. Impedanța vasculară la curgerea sangvină	228
13.9. Modelul analogic al circulației sangvine	231
13.10. Studiul circulației sangvine cu ajutorul trasorilor	234

CAPITOLUL 14

Aspecte biofizice ale schimburilor de gaze respiratorii	241
14.1. Parametrii schimbului pulmonar de gaze	243
14.2 Modelul matematic al schimburilor de gaze	249

CAPITOLUL 15

Biofizica fonică	252
15.1. Biofizica pigmentilor fotosintetizatori	252
15.2. Spectrele pigmentilor fotosintetizatori în domeniul vizibil	254
15.3. Interacțiunea clorofilei cu apa	259
15.4. Fotosinteza	263
15.5. Fotoluminiscenta	270
15.6. Elemente de biofizica pigmentilor fotosensibili	276

CAPITOLUL 16

Biofizica fotorecepției celulare	284
16.1. Structura celulei fotoreceptoare	284
16.2. Structura retinei	287
16.3. Cuplarea transformărilor rodopsinei cu modificările potențialului de membrană	289

16.4. Potențiale de acțiune și curenți ionici de excitație	295
--	-----

CAPITOLUL 17

Elemente de biofizică auditivă	301
17.1. Structura și funcțiile celulelor ciliate din urechea internă	301
17.2. Hidrodinamica urechii interne	304
17.3. Bioelectrogeneza celulelor ciliate	307
17.4. Procesarea informației auditive în sistemul nervos central	309

CAPITOLUL 18

Biofizica contracției musculare	311
18.1. Structura fibrei musculare striate	312
18.2. Mecanismul contracției musculare	316
18.2.1. Controlul sinaptic al contracției musculare	316
18.2.2. Cuplul excitație-contracție	317
18.3. Noțiuni de termodinamica contracției musculare	322
18.4. Modelul fizic al musculaturii cardiace	326
18.5. Elemente de biomecanica tendonului și ligamentelor musculaturii striate	330
18.5.1. Proprietăți de elasticitate	331
18.5.2. Proprietăți de vâscoelasticitate	333
18.5.3. Elemente de biomecanica tendonului și ligamentului	335

BIBLIOGRAFIE	341
---------------------	------------

Cuvânt înainte

Ca specialitate de graniță a științelor fiziologice, care studiază procesele biologice din punct de vedere fizic, Biofizica a devenit în ultimele decenii una din disciplinele de bază ale învățământului biomedical și tehnic. Coborând de la nivel de organism întreg la nivel celular și subcelular, această nouă disciplină contribuie substanțial la descifrarea și înțelegerea multora din manifestările electro-chimice și proprietățile biologice ale materiei vii.

Apariția unor materiale elaborate de specialiști ai domeniului este mai mult decât binevenită. Ea acoperă un gol resimțit încă, în țara noastră atât pe plan cognitiv cât și din punct de vedere aplicativ.

“Introducere în biofizica moleculară și citotisulară”, editată de Rodica Maria Isac, Florin Topoliceanu și Dorina Emilia Creangă, reprezintă un astfel de material util instruirii studenților în bioinginerie, medicină și biologie. Cele 18 capitole care compun volumul, conțin principalele cunoștințe clasice și noi, referitoare la bazele morfo-chimice și electrofiziologice ale diverselor forme de activitate celulară. Rând pe rând sunt expuse particularitățile structurale și electrochimice ale principalilor constituenți celulari și subcelulari, insistându-se asupra rolului lor în realizarea diverselor forme de activitate celulară și tisulară.

O atenție deosebită este acordată fenomenelor biofizice care stau la baza electrogenezei și schimburilor ionice membranare generatoare de răspunsuri celulare specifice.

Datele de biofizică celulară și moleculară sunt întregite de elemente de biomecanică și biocibernetică informațională.

In ansamblu, materialul elaborat de autori reprezintă o realizare didactică utilă fundamentării cunoștințelor biomedicale și tehnice pe baze biofizice corecte și actuale.

Iași, aprilie 2000

Academician Ioan Haulică

Prefață

Acest volum deschide seria problematicilor actuale din domeniul de Biofizică și se adresează în special studenților Facultății de Bioinginerie medicală, dar și celor interesați prin specificul formării lor interdisciplinare, să aibă acces la avalanșa informațională din domeniul științelor bio- și tehnico-medice, în care această disciplină de graniță și-a căpătat un loc privilegiat.

Elementele de Biofizică sunt structurate pe tematici care fără să aibă pretenția de a fi exhaustive, vin să completeze cunoștințele dobândite prin integratele de biologie generală și sistemică, în cadrul modulelor de biologie celulară și moleculară, citohistologie, biochimie, fiziologie, biometrologie și bioinstrumentație medicală.

Abordarea biofizică prin prisma științelor exacte ale unor probleme ca cele de modelare matematică, termodinamică, biochimică, biomecanică sau electrochimie sunt facile pentru studenții și viitorii practicieni în bioingineria medicală, dat fiind accesul acestora la o curriculă interdisciplinară complexă. De altfel, în aceasta seregăsesc inserate în mod coerent, alături de științele biomedicale și umaniste, cele de matematică – informatică, fizică – chimie, teoria sistemelor, știința și tehnologia materialelor, electronica medicală și alte discipline cu caracter tehnico-medical.

Prezentarea fenomenelor de transfer, bioelectrogenza, microreologia, biomecanica citotisulară, modelare-simulare, comunicare celulară și control senzitivo-senzorial, ca fenomene fundamentale ale biofizicii celulare și sistemice, deschide o fereastră spre înțelegerea unor direcții prioritare ale

unui învățământ medical cu un grad accentuat de tehnologizare. Dintre acestea, rețin în mod deosebit atenția descrierea și elucidarea unor procese complexe bioenergetice celulare la nivel infra- și supra molecular cu largi aplicații în biotehnologie, biorobotică protetică, biocibernetica controlului și reglării biosistemelor, biomateriale inteligente și biomecanica sistemelor protetice, telemedicina, inteligența artificială, sau în tehnologiile de informatizare a sistemelor de sănătate.

În sprijinul formării inter- și transdisciplinare a specialiștilor în bioingineria medicală s-a avut în vedere ca structurarea capitolului de Biofizică generală să permită studenților accesul direct la problematica biostructurală, moleculară și citotisulară, ca bază ulterioară a înțelegerii biofizicii sistemice, privind implicațiile unor componente moleculare, intracelulare și citotisulare, la realizarea principalelor dispozitive funcționale ale biosistemului uman.

Sperăm că efortul nostru, finalizat în editarea unui prim volum din ciclul dedicat problemelor actuale ale disciplinelor de graniță biomedicale și tehnico-medice, reprezintă un început în formarea complexă bio- și tehnico-medicală, a viitorilor specialiști în profesiunea de bioinginer medical.

Extinderea cunoștințelor abordate prin prisma moleculară, celulară și sistemică a Biofizicii, devine utilă și pentru cei interesați în domeniile conexe (fizicieni, chimiști, biologi, ingineri cu preocupări în electronica medicală, biomecanică, biotehnologie și protetică medicală, biomatematică-informatică medicală), care sunt preocupați de realizarea unor colaborări în echipă, alături de medici și bioingineri, în serviciile de asistență medicală, cercetare și învățământ superior medical.

CAPITOLUL 1

Apa biostructurală și interacțiuni moleculare

În mod excepțional *apa*, una din cele mai răspândite substanțe de pe globul pământesc este singurul lichid anorganic din organismul uman, fără de care nici un proces vital nu este posibil. Proporțiile de apă sunt variabile în raport cu vârsta și cu cantitatea de țesut adipos, acestea fiind mai reduse la obezi și vârstnici (Tabelul 1).

Tabelul 1. Procentajul de apă din diferite țesuturi

(după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Tipul de țesut	Țesut adipos	Spori de ciuperci	Organism uman adult	Țesut hepatic	Țesut nervos	Organismul meduzelor
Conținut în apă	30%	45-50%	65-70%	73%	84%	95%

1.1. Structura și proprietățile apei

Structura chimică a apei este deosebit de simplă, iar proprietățile sale fizico-chimice îi conferă un rol fundamental în menținerea alcătuirii și funcționării edificiilor macromoleculare celulare (îndeosebi ale proteinelor și acizilor nucleici).

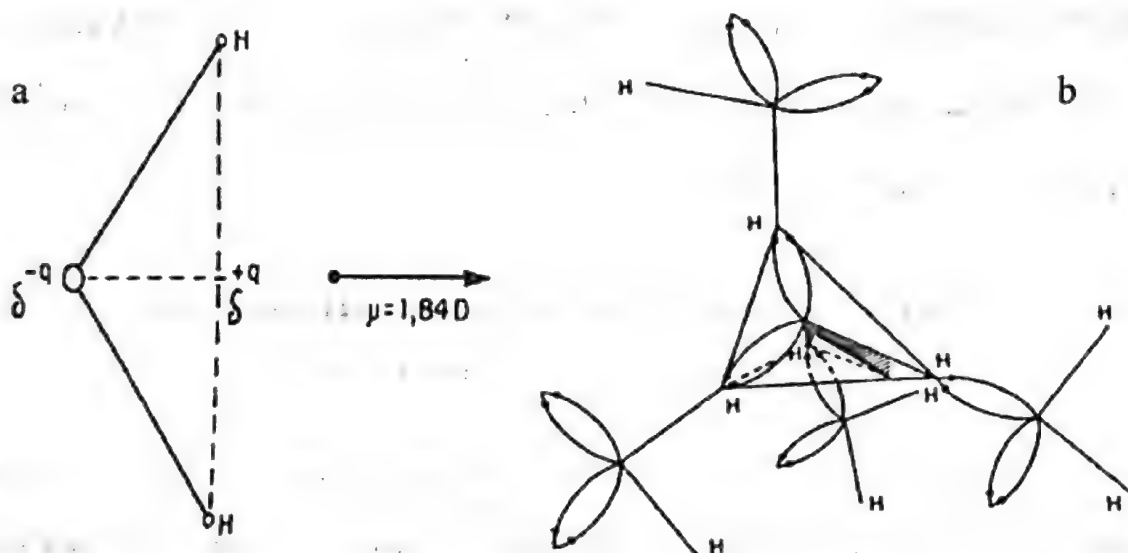


Figura 1. (a). - Structura plană a moleculei de apă și orientarea momentului dipolar electric; (b) - Asocierea prin legături de hidrogen a moleculelor de apă (după F. Gremy, 1982).

Constanta dielectrică foarte mare ($\epsilon_r=80$ la 20°C) reprezintă reflectarea macroscopică a caracterului *dipolar electric pronunțat* a moleculelor de apă, valoarea acestuia fiind de 1,84 Debye (Figura 1a). Constanta dielectrică mare a apei îi

conferă remarcabile proprietăți solubilizatoare mai ales că multe molecule organice sunt polare și au o mare afinitate pentru apă (glucidele, majoritatea aminoacizilor, etc.) și antrenează disocierea cristalelor ionice (săruri minerale).

La rândul lor moleculele de apă disociază în anioni oxidril HO^- și cationi H^+ , aceștia din urmă asociindu-se, de regulă cu molecule de apă nedisociate pentru a forma ionul H_3O^+ .

Între moleculele de apă vecine se formează *legături de hidrogen*, deoarece protonii unei molecule sunt atrași de atomii de oxigen ai moleculelor vecine (Figura 1b).

Caracterul dipolar electric și existența legăturilor de hidrogen stau la baza celor mai multe dintre proprietățile apei și comportării sale în mediile biologice. Legăturile de hidrogen reprezintă un tip de interacțiuni slabe intermoleculare destul de răspândite în structurile macromoleculelor așa cum se va menționa și în paragrafele următoare.

Lăsând la o parte detaliile legate de interacțiunile intermoleculare ale apei în stare lichidă sau solidă vom pune accentul pe de o parte, pe caracteristicile sale macroscopice în comparație cu alte structuri similare și pe de altă parte pe variațiile densității apei ($0,91 \text{ g/cm}^3$) cu temperatura care atinge un maximum de 1 g/cm^3 la 4°C .

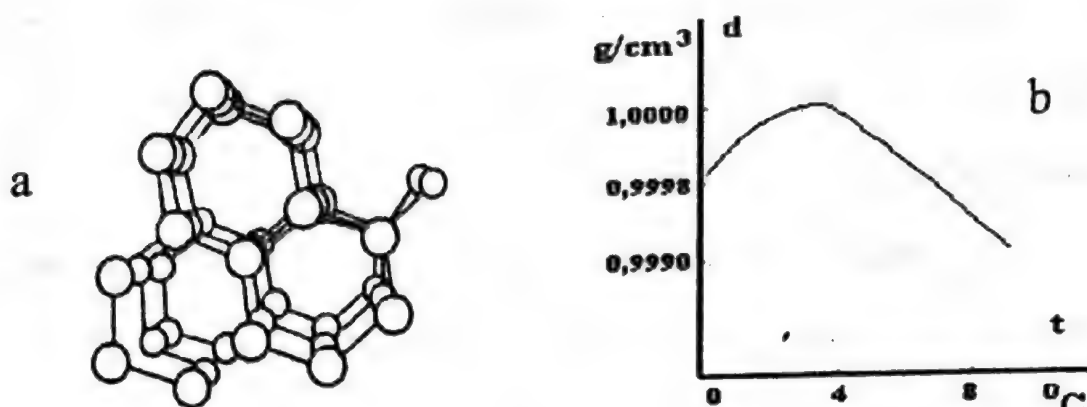


Figura 2. (a) - Structura cristalină a gheții este bazată pe o rețea hexagonală de molecule legate între ele prin legături de hidrogen; (b) - Variația densității apei cu temperatura (după F. Greymy, 1982)

Alături de densitatea mai mică a gheții, față de apă lichidiană se reține și structura de rețea hexagonală a moleculelor de apă transformate în gheață, concomitent cu mărirea volumului acesteia (Figura 2a – 2b). Datele menționate atrag atenția asupra problemelor de criobiologie, înghețarea și dezghețarea biostructurilor fiind în centrul unor cercetări complexe interdisciplinare, privind conservarea non-distructivă și funcțională a acestora.

Se avansează idea că dacă, la fel ca la alte substanțe, densitatea stării solide ar fi mai mare decât a celei lichide, gheața formată în anotimpul rece, ar cădea la fundul lacurilor, râurilor și mărilor și numai o mică parte din această gheață de adâncime s-ar putea topi la căldura soarelui în anotimpul cald;

astfel depozitele de gheață de pe fundul apelor ar fi permanente și climatul ar fi total diferit.

Dintre proprietățile fizico-chimice cele mai importante pentru rolul jucat în organism menționăm *punctele de solidificare* (t_s) și *vaporizare* (t_v), ele fiind sensibil mai ridicate decât la alte substanțe cu structură asemănătoare (H_2S , H_2Se , $HeTe$, etc.) sau cu același număr de opt electroni moleculari periferici (Ne , HF , NH_3 , CH_4 , etc.) (Figura 3).

Căldura de topire a gheții este de 80 kcal/mol, iar cea de vaporizare a apei este de 537 kcal/mol. Eliminarea din organism prin vaporizare a unei cantități semnificative de energie (537 kcal), la fel ca și valoarea ridicată a *căldurii specifice* (18 cal/mol.grad), evidențiază rolul esențial pe care apa îl îndeplinește în cadrul mecanismelor de termoreglare.

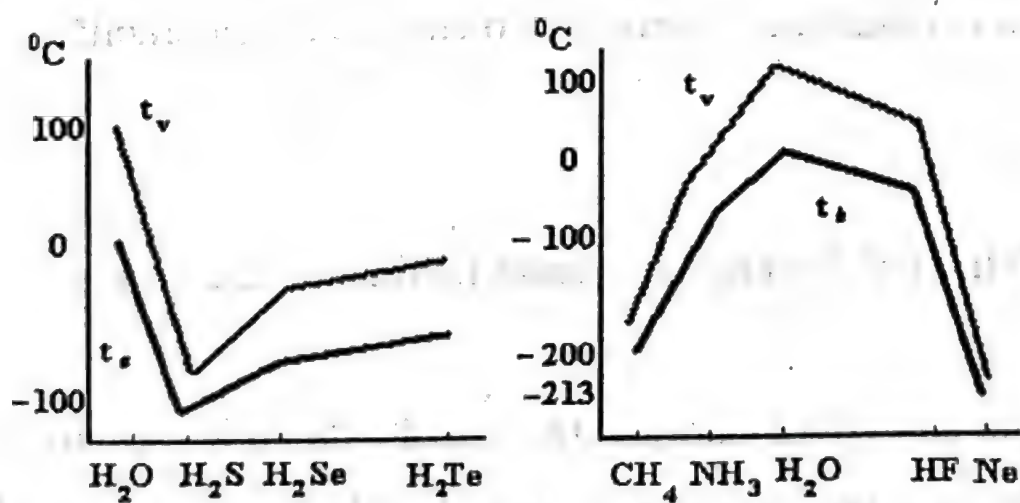


Figura 3. Punctele de solidificare și de vaporizare ale apei în comparație cu alte molecule (modificat, după F. Greym și J. Perrin, 1975)

Vâscozitatea apei, reflectă nivelul interacțiunilor dintre moleculele de apă din straturile învecinate în timpul curgerii și este relativ redusă, la 10^{-2} Poise la 20 °C față de glicerină, la care aceasta ajunge până la 15 Poise la temperatură echivalentă, fapt datorat legăturilor de hidrogen care se rup și se refac cu mare frecvență în apa lichidă.

Tabel 2. Variația vâscozității apei cu temperatura
(după F. Greym și J. Perrin, 1975)

Temperatura (° C)	10	20	30	40
Vâscozitatea (centiPoise)	1,30	1,00	0,80	0,65

Tensiunea superficială a apei este relativ mare, de 73 erg/cm², datorită existenței unui mare număr de interacțiuni intermoleculare, care pentru a le rupe și a scoate o moleculă la suprafața lichidului, este nevoie de o energie considerabilă.

1.2. Principalele compartimente lichidiene din organism

La un individ cu o greutatea medie de 70 Kg, cantitatea totală de apă ajunge până la 70 de litri (57% la adult și 75% la

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

noi născuți din greutatea corporală). Obezitatea scade procentajul de apă corporală sub 45% din greutatea corporală.

Există două mari compartimente lichidiene în organism reprezentate de sectorul intracelular și cel extracelular, subdivizat în sectoarele: interstițial și intravascular - plasmatic.

Delimitarea sectorului intracelular de cel extracelular este realizată de membranele celulare care asigură totodată și comunicarea dintre acestea, prin microtransportul ionilor și moleculelor mici, ca și prin macrotransportul macromoleculelor și a diferitelor particule.

Compartimentul intracelular conține aproximativ 25 de litri de apă, în timp ce în compartimentul extracelular sunt stocate 15 litri de apă, distribuite între sectorul **interstițial** (12 litri) și **intravascular** (3 litri în componenta plasmatică și 2 litri la nivelul celulelor sangvine). Aceste două subcompartimente sunt separate de membranele endoteliale sau capilare care sunt membrane dializante permițând circulația pasivă a ionilor și moleculelor mici.

În afara lichidului interstițial și al celui vascular plasmatic, la nivelul spațiului lichidian extracelular se pot adăuga și *lichidele așa zis transcelulare* reprezentate de cele din cavitățile seroase (pleură, pericard, peritoneu, articulații), lichidul cefalorahidian și al diverselor secreții (digestive,

lacrimale, oculare etc.) care ajung la 1-3% din greutatea corpului.

Ca lichid extracelular este considerată adesea și limfa, deoarece vasele limfatice drenează spațiul interstițial (volumul limfatic fiind însă insuficient de precis determinat).

Tabelul 3. Repartiția procentuală a apei în compartimentele lichidiene ale organismului uman (după F. Gremy și J. Perrin, 1975)

Compartiment	Procente din greutatea corporală	
	Bărbați	Femei
Extracelular Interstițial	10,9	10,7
Extracelular Intravascular	4,1	4,3
Intracelular	45	40
Total	60	55

1.3. Interacțiuni intermoleculare

În dinamica structurării și dezvoltării organismului uman de la nivelul embriogenezei și până la vârsta adultă edificiile moleculare și macromoleculare (în special proteice, glicoproteice sau lipoproteice de tip globular sau fibrilar), iau parte la morfogenează și la realizarea arhitecturii sistemului viu.

De-a lungul evoluției filogenetice și ontogenetice, acestea se găsesc într-o continuă restructurare în cadrul unui turnover metabolic și în prezența unor permanente interacțiuni la nivel molecular.

Dintre interacțiunile la nivel molecular de mică energie menționăm: *legăturile de hidrogen, legăturile hidrofobe, interacțiunile dipol - dipol și forțele ionice* (Tabelul 4).

Legăturile hidrofobe sunt cele existente între molecule sau grupări de atomi care nu au caracter polar de tipul moleculelor de apă

Interacțiunile dipol - dipol se grupează, după natura dipolilor implicați, în mod permanent (interacțiuni Keeson) sau indus (interacțiuni Debye).

În contrast cu interacțiunile de mică energie, *legăturile covalente* sunt legături de energie mare - sute de kJ/kmol, asigurând stabilitatea structurilor moleculare. Pentru reprezentarea lor, în cadrul unor relații și legi fizice sau chimice, s-au notat cu q și μ sarcina electrică și respectiv momentul dipolar electric, iar cu α și k au fost notate polaritatea electrică și respectiv constanta care exprimă gama proprietăților electrice ale mediului prin care se transmit interacțiunile (invers proporțională cu permitivitatea electrică).

K_B este constanta lui Boltzman, T_r include T ca

Tabelul 4. Principalele tipuri de interacțiuni moleculare

(modificat, după F. Gremy, 1982)

Tipul legăturii	Relații cantitative	Valoarea energiei kJ/kmol	Exemple
Covalente		400-800	Structuri moleculare la molecule mici, structuri primare la proteine și acizi nucleici
Ionice (între grupări încărcate cu sarcină electrică)	$k \frac{q_1 q_2}{r}$	5-20	Solubilizarea și hidratarea ionilor
Sarcină-dipol permanent	$k \frac{\mu^2 q^2}{3K_B T r^3}$	1-5	Proprietățile polielectroliților
Sarcină-dipol indus	$k \frac{\alpha q^2}{r^3}$	0,5-2	Solubilizarea și hidratarea ionilor
Interacțiuni Keesom (dipol permanent - dipol permanent)	$k \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3K_B T r^6}$	2-10	Mecanismul de stabilire al legăturii de hidrogen
Interacțiuni Debye (dipol permanent - dipol indus)	$k \frac{\alpha \mu^2}{r^6}$	1-5	Interacțiuni stereospecifice la distanță mică la toate tipurile de grupări chimice
Interacțiuni London (dipol instantaneu - dipol instantaneu)	$k \frac{\alpha^2}{r^6}$	1-5	Interacțiuni stereospecifice la distanță mică la toate tipurile de grupări chimice
Interacțiuni de hidrogen		8-40	Interacțiuni secundare ale proteinelor, împerecherea bazelor acizilor nucleici
Interacțiuni hidrofobe		4-30	Interacțiuni lipide-lipide, structuri terțiare ale proteinelor

tempera

particule

cuplarea

în stabil

cătred

hormon

de infor

dizolvat

mare m

organism

din care

de la r

transcon

și vase

preferen

biofizici

Topolice

1989, M

M. Isac ș

și R. M.]

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

temperatură absolută și r este distanță dintre centrele particulelor ce interacționează.

Interacțiunile slabe, de natură fizică, intervin în cuplarea enzimă - substrat, în interacțiunea antigen - anticorp, în stabilitatea structurilor biomembranare, în recunoașterea de către receptori membranari a neurotransmițătorilor și hormonilor, precum și a medicamentelor, asigurând schimbul de informație intercelular.

Interacțiunile intermoleculare ale apei cu substanțele dizolvate sau suspendate printre moleculele sale, determină în mare măsură proprietățile soluțiilor și suspensiilor apoase din organism, adică ale lichidelor din marile compartimente hidrice din care am amintit mai sus.

Importanța protonilor hidrici din structurile celulare și de la nivelul compartimentelor hidrice în fenomenele de transconformare, permeabilitate, electrogeneză, contractilitate și vasomotricitate au constituit obiectul unor studii preferențiale ale cercetătorilor ieșeni biologi, fiziologi, biofizicieni și biochimiști (F. Topoliceanu 1974, F. Topoliceanu și I. Haulică 1984, F. Topoliceanu și I. Haulică 1989, M. Isac și R. M. Isac 1985, M. Isac și R. M. Isac 1989, M. Isac și R. M. Isac 1990, M. Isac și R. M. Isac 1991, M. Isac și R. M. Isac 1992).

CAPITOLUL 2

Lipidele și proprietățile lor fizico-chimice

Lipidele reprezintă una din componentele importante ale structurilor vii, fiind constituenți de bază ai țesutului adipos și ai sistemului de membrane celulare (plasmalema, membranele mitocondriilor, reticulul endoplasmic, etc.). Deoarece asupra aspectelor de biofizica membranelor ne vom referi mai în detaliu în capitolele următoare, precizăm că cele mai importante tipuri de lipide din membrană sunt: *fosfolipidele* (fosfogliceride și sfingolipide) și *glicolipidele* (Figura 4). Alcoolul cu care se asociază acizii grași din compoziția fosfolipidelor putând fi glicerol sau sfingozină, rezultă că deci avem de-a face cu fosfogliceride și sfingolipide.

Dintre cele mai cunoscute lipide membranare menționăm fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinozitolul. Unii autori, includ în rândul lipidelor și moleculele de colesterol.

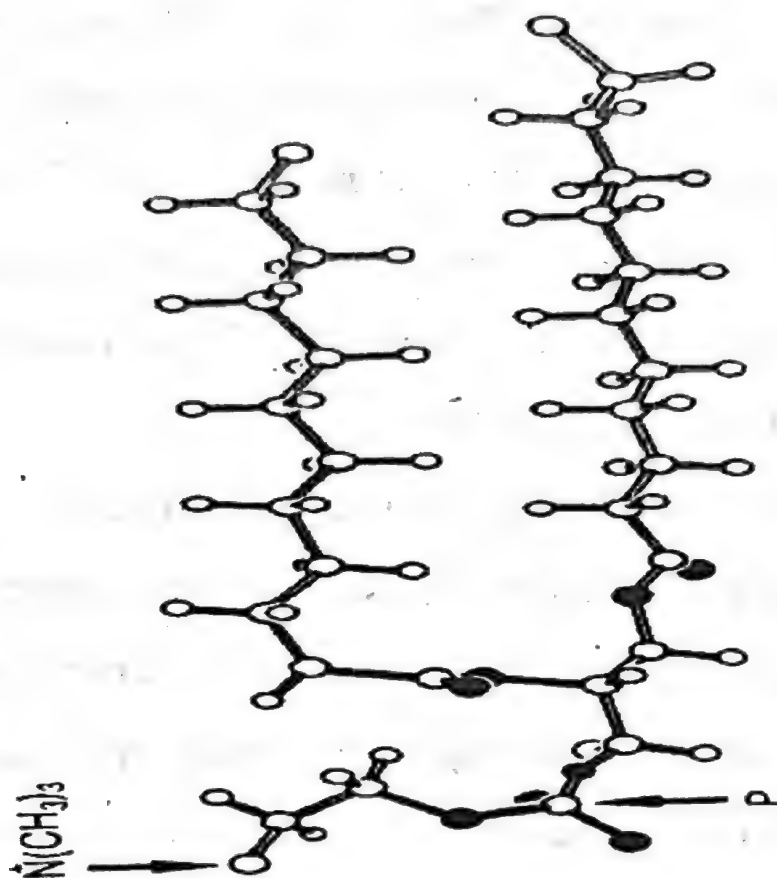


Figura 4. Structura unei molecule lipidice (după J. Darnell, 1970)

2.1. Structura lipidelor și interacțiunile lor intermoleculare

Structura acestor molecule lipidice conține în principal un *pol hidrofil* (un cap polar) și două *lanțuri de acizi grași saturați sau nesaturați (hidrofobe)*. În funcție de natura acizilor grași din straturile bilipidice din biomembrane acestea pot avea o fluiditate mai mare sau mai mică.

Organizarea în bistrat lipidic din membrane este consecința caracterului dipolar electric pe care îl prezintă polul

hidrofil - tendința acestuia de a interacționa cu moleculele polare de apă din mediile intracelular și extracelular. Orientarea polilor polari către exterior și respectiv către interiorul celulei are drept consecință orientarea lanțurilor de acizi grași unul către celălalt - se spune că între ele se manifestă *forțe de interacțiune de tip hidrofob*.

Alte forțe ce stabilizează bistraturile lipidice din compoziția membranei (unde aceste molecule coexistă împreună cu diverse tipuri de molecule proteice cu pronunțat caracter dipolar electric), sunt *forțele van der Waals și legăturile de hidrogen*.

În mediile apoase *in vitro*, lipidele se organizează sub formă de micle globulare. Ele pot elimina apa din interiorul miclei unde se grupează lanțurile hidrofobe de acizi grași. Capetele polare rămân către exteriorul miclei interacționând prin legături electrice de tip dipol - dipol cu moleculele polare de apă.

Eliberarea moleculelor de apă din spațiul interior al miclei, duce la o creștere a entropiei sistemului, iar asocierea spațială simetrică a lipidelor, duce la o scădere a acesteia.

Astfel de caracteristice energetice determină tendința de autoînchidere a acestor structuri cu delimitarea unor

2.2. Orga

Ur
fosfolipid
intermedi
termotrop
liotropic.
termotrop
apă.

La
lamelară,
F_c
dispunere
perpendic

F_c
de circa
polilor hi

F_c
în colțuri

compartimente, în care orice breșă reprezintă un inconvenient din punct de vedere energetic (G. Benga, 1976).

2.2. Organizarea sistemelor lipide-apă

Una din proprietățile fizice remarcabile ale fosfolipidelor este *mezomorfismul*, adică existența stărilor intermediare între cea solidă și lichidă (mezomorfism termotropic) ca și între cea de cristal și soluție *mezomorfism liotropic*. Fazele liotrope prezintă și ele *mezomorfism termotropic*, în funcție de temperatură și de concentrația de apă.

Luzzatti și col. (1968) au descris mai multe faze: *faza lamelară*, *faza de gel*, *faza hexagonală I* și *faza hexagonală II*.

Faza lamelară (Figura 5), se caracterizează prin dispunerea bistratului lipidic cu lanțurile de acizi grași orientate perpendicular pe axa determinată de polii hidrofilii.

Faza de gel se caracterizează prin orientarea la un unghi de circa 30 de grade a lanțurilor de acizi grași față de axa polilor hidrofilii (Figura 6).

Faza hexagonală I este dată de miclele globulare situate în colțurile și centrul unui hexagon, moleculele polare din

mediul de dispersie fiind eliminate din interiorul micelilor (Figura 7a)

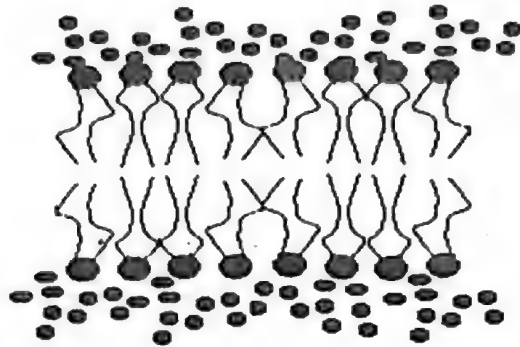


Figura 5. - Dublu strat lipidic organizat în fază lamelară în mediul exterior alcătuit din molecule polare

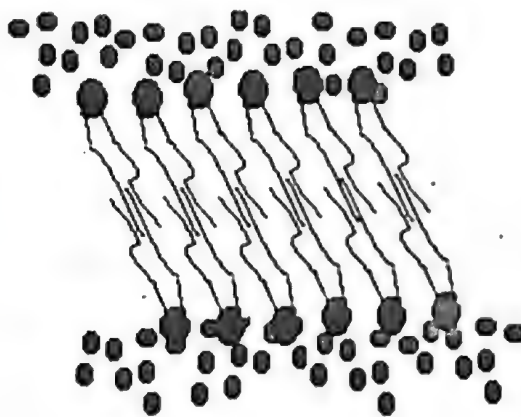


Figura 6. - Dublu strat lipidic organizat în fază de gel în mediul exterior alcătuit din molecule polare

Faza hexagonală II (Figura 7b) diferă prin aceea că, micellele prind în interior moleculele polare ale mediului de dispersie, în timp ce capetele polare ale lipidelor din micelle sunt

INTRODUC

orientate spre
hidrofobe, s

Org

celor mai r
forma de
microorgan
alături de
lipide.

a.



Figura 7. (a) molecule polare alcătuit din

2.3. Teac

Lă

pondere

orientate spre interiorul miclei, iar lanțurile de acizi grași, hidrofobe, spre exterior.

Organizarea lipidelor membranare se bazează, în cazul celor mai multe din membranele organismelor superioare, pe forma de bistrat în faza lamelară, dar în cazul microorganismelor sau a membranei interne a mitocondriei, alături de porțiuni de bistrat lipidic lamelar apar și miclele de lipide.

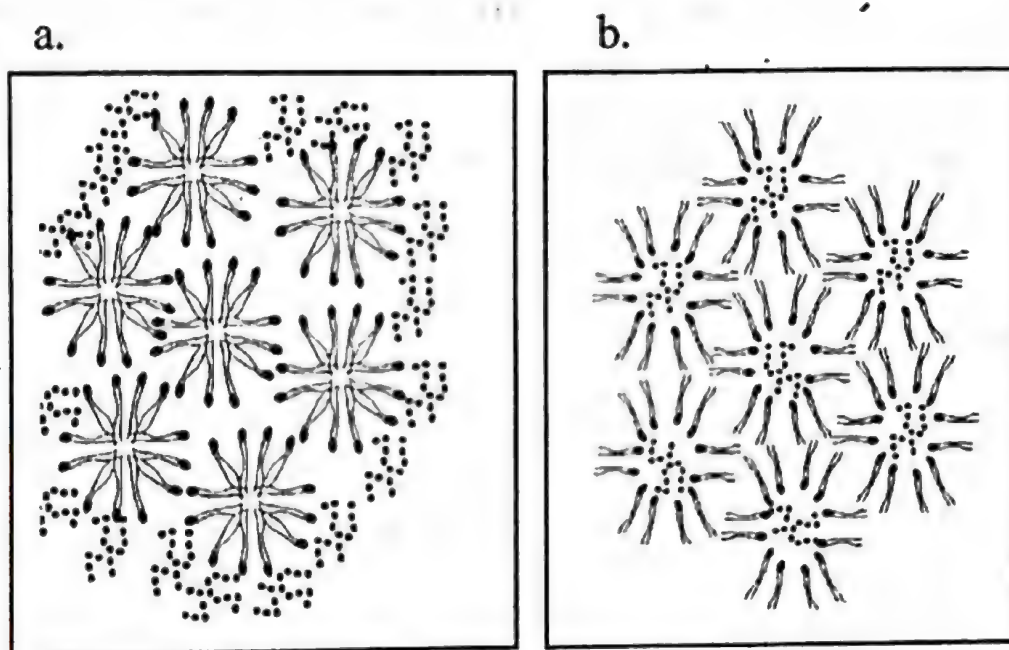


Figura 7. (a) - Lipide organizate în faza hexagonală I, în mediu alcătuit din molecule polare; (b) - Lipide organizate în faza hexagonală II, în mediu alcătuit din molecule polare

2.3. Teaca de mielină a axonului neuronal

La nivelul *neuronului* *teaca de mielină a axonului* are o pondere maximală a lipidelor incluse într-o structură

membrana, din care, circa 70 - 80% din greutatea uscată o reprezintă lipidele, sub formă de colesterol, fosfolipide, glicolipide și doar 30% proteine (Figura 8).

Excluderea apei și ionilor din compoziția mielinei explică și principala funcție a acestei membrane, de izolator electric și de barieră de permeabilitate pentru ioni.

Transportul ionilor prin membrana axonală se realizează la nivelul *nodurilor Ranvier*, unde teaca de mielină se întrerupe (iar între două noduri Ranvier consecutive se delimitează o celulă Schwann) (Figura 9).

Primele studii de microscopie electronică (înainte de anii '60), realizate pe acest tip de membrană, au fost efectuate de Robertson.

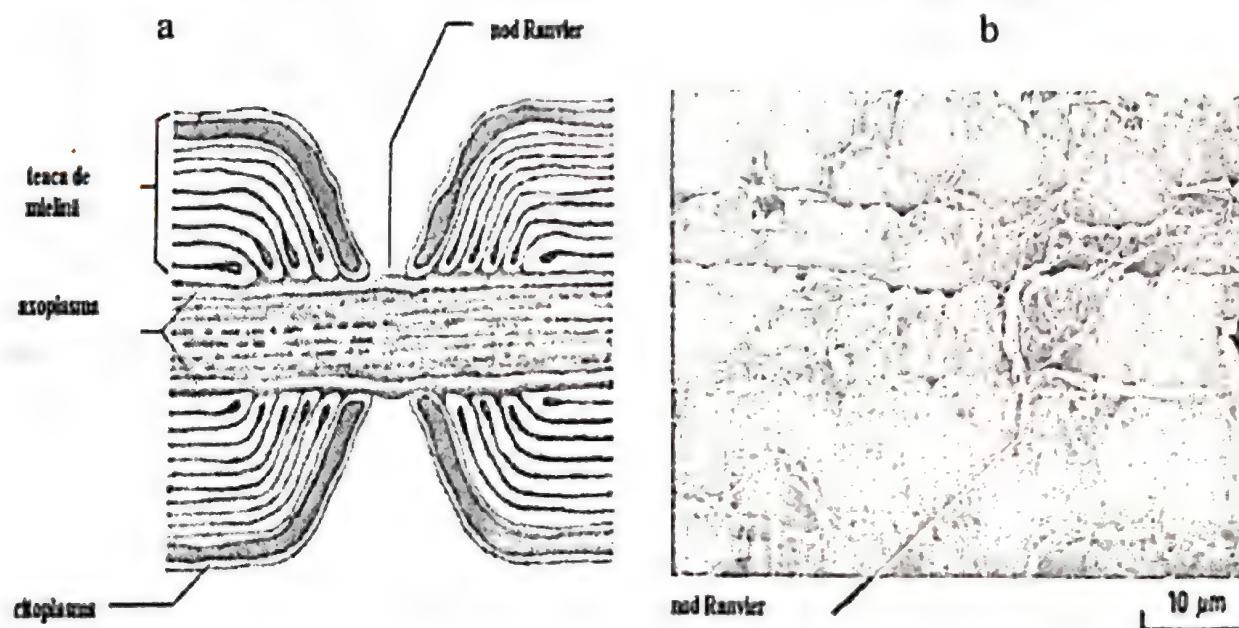


Figura 8. a - Reprezentare schematică a celulelor Schwann și nodului Ranvier; b - Imagine obținută la microscopul electronic (după J. Darnell și col. 1990)

Acesta a relevat asimetria bistratului, dată de compoziția chimică diferită a stratului lipidic intern față de cel extern, contribuind în mare măsură la perfecționarea modelului structural propus anterior de Danielli și Davson pe baza studiilor de tensiune superficială și a celor de permeabilitate.

Glicolipidele constituie o parte semnificativă a lipidelor mielinice (30%), și sunt reprezentate în special de:

∀ *galactocerebrozide* (ex.: galactozil-ceramida și derivatul său sulfatide - implicate în interacțiuni celule Schwann – axon);

∀ *paraglobulinele* (ex.: sialozil-paraglobozide, implicate ca anticorpi anti LM₁);

∀ *sulfat de glucoronil paraglobozidă* cu rol în interacțiunea anticorp – anti SGPG, a căror perturbații stau la originea neuropatiilor senzitivo - motorii demielinizate.

Prezența glicolipidelor (glicosfingolipide, ganglioze, galactocerebrozide și paraglobozide) și încadrarea asimetrică în membrana plasmatică și dublul strat lipidic prin componenta ceramidică, odată cu expunerea extracelulară a componentei glucidice constituie ținta pentru autoanticorpi ce determină numeroase alterări ale canalelor ionice sau demielinizări mediate imunitar.

Distribuția particulară a gangliozidelor (GM_1 , GD_{1a} și b și GQ_{1b}) în membranele axonale cu precădere la nivelul nodurilor Ranvier, în regiunile paranodale sau sinaptice, cât și în celulele Schwann, ale fibrelor motorii și senzitive determină o largă varietate de afecțiuni clinice autoimune.

Acestea pot fi explicate prin implicarea lor în reglarea diverselor procese fiziologice cât și prin interacțiunile lor cu receptorii factorilor de creștere, canale ionice, molecule de contractilitate și recunoaștere celulară (E. Fournier, 1998).

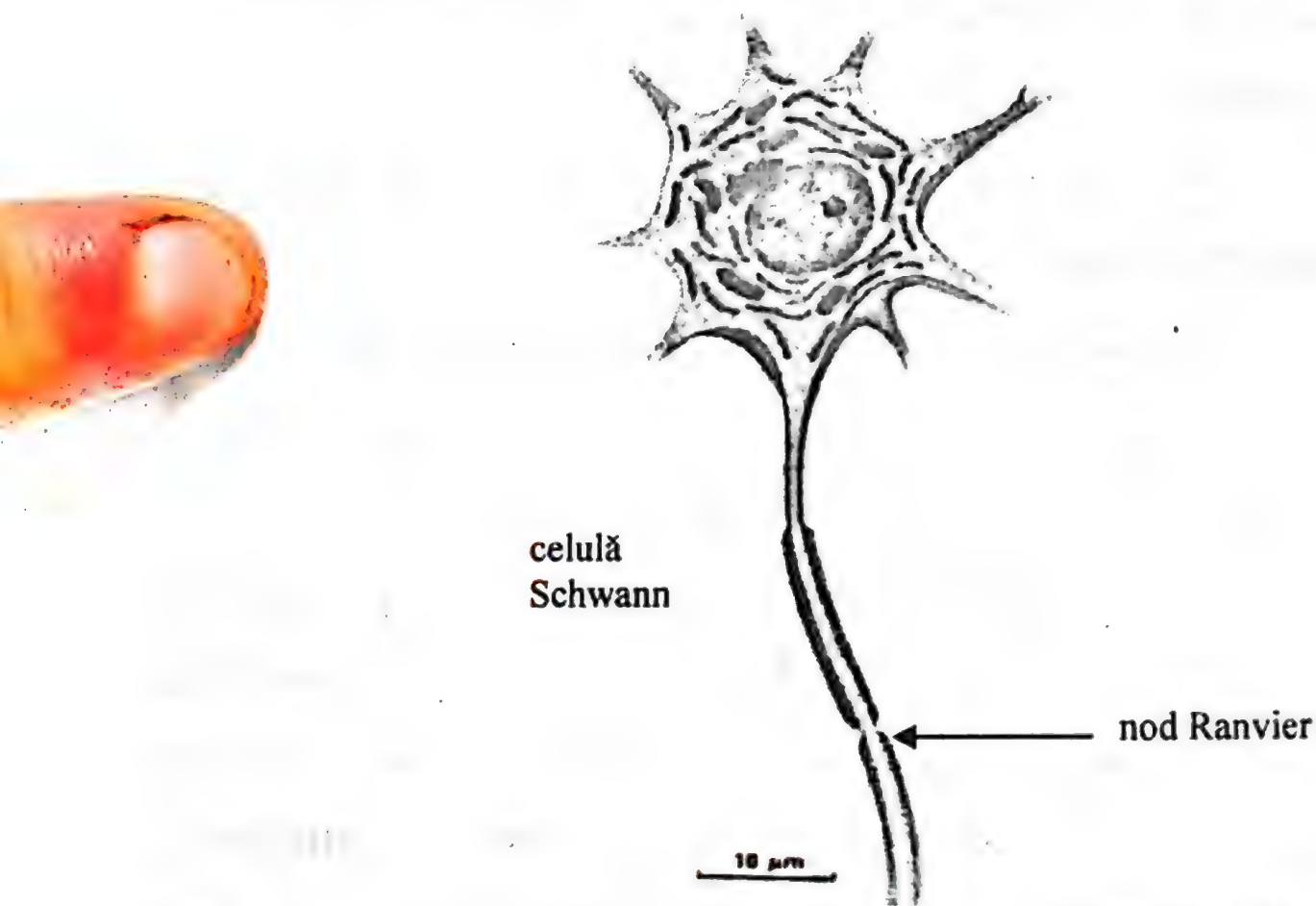


Figura 9. - Celula neuronală cu noduri Ranvier și celule Schwann care sunt de-a lungul axonului mielinizat (după J. Darnell 1990)

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

În celelalte tipuri de membrane, lipidele au ponderi de numai 45 - 50% (modelul mozaicului fluid) coborând chiar la 30% în membranele care sunt bogate în proteine (modele bazate pe subunități lipoproteice sau pe micle de lipide) și îndeplinesc funcții celulare mai complexe.

CAPITOLUL 3

Proteine, interacțiuni moleculare și proteine enzimatic catalitice.

Proteinele sunt macromolecule biologice care provin din polimerizarea unui număr mare (peste o sută) de molecule de aminoacizi. Cei douăzeci de aminoacizi existenți în natură se caracterizează prin structuri de tipul $H_2N.CHR.COOH$ care diferă prin structura radicalului R .

Aminoacizii sunt amfoliți - putând să disocieze în mediu apos atât ca acizi cât și ca baze. Legarea între moleculele de aminoacizi se realizează prin intermediul *legăturii peptidice* sau *aminice*, care apare prin redistribuirea densității norului electronic al grupărilor atomice $C=O$ și NH .

3.1. Legătura peptidică

Toți cei patru atomi ai grupării peptidice sunt coplanari iar caracterul dipolar electric este semnificativ pentru gruparea peptidică (Figura 10). Unghiurile dintre legăturile interatomice

au valori apropiate de 120° , iar lungimea legăturii C-N din cadrul grupării peptidice este mai mică ($1,32 \text{ \AA}$) decât a legăturii C-N simple ($1,47 \text{ \AA}$).

Legăturile carbon - azot și carbon - oxigen au un ordin intermediar între unu și doi, ca urmare a deplasării unei părți din densitatea electronică a legăturii duble C=O către legătura simplă C-N. Caracterul parțial de legătură dublă a legăturii C-N din gruparea peptidică împiedică rotirea liberă în jurul acestei legături ceea ce nu este valabil și pentru legătura simplă C-N.

Legăturile peptidice asigură *structura primară* a proteinelor și înlanțuirea moleculelor de aminoacizi. Caracterul de donor de protoni al grupării NH și caracterul de acceptor de protoni al grupării C=O favorizează formarea de *legături de hidrogen* între porțiuni vecine ale lanțului de aminoacizi, ceea ce reprezintă *structura secundară* a proteinelor.

Această structură se optimizează din punct de vedere energetic (energie minimă) și entropic (entropie minimă) pentru un număr maxim de astfel de legături de hidrogen. Unele dintre aceste legături sunt între catene peptidice diferite (intercatenare), în timp ce altele sunt între porțiuni diferite ale aceleiași catene peptidice (intracatenare). Configurația spațială conferită proteinelor de existența structurii secundare poate fi de " *α -helix*", de "*foaie pliată*", de "*ghem randomic*", etc.

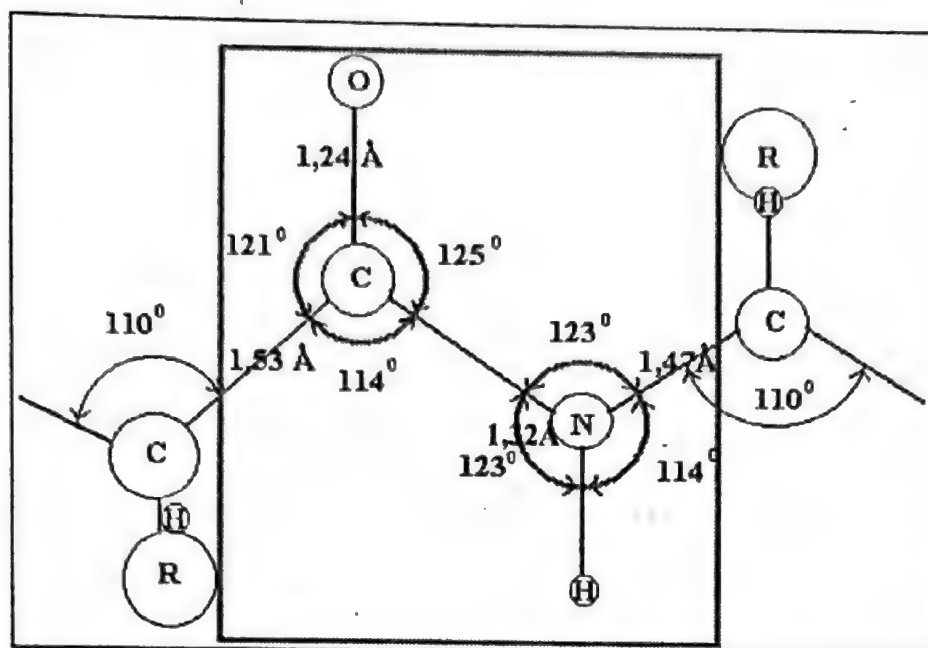


Figura 10. - Legătura peptidică și caracteristicile sale configuraționale (modificat după S. Bădilescu și C. Bădilescu 1981)

Multe proteine au și o *structură terțiară*, iar unele au chiar și o *structură cuaternară* (Figura 11), ca urmare a formării de *legături disulfurice* (prin interacțiunea grupelor sulfhidril din moleculele aminoacizilor sulfurați), de *legături covalente difosfoesterice* (între molecule de serină), a *interacțiunilor ionice*, a *interacțiunilor hidrofobe* și a noi *legături de hidrogen*.

Caracterul enzimatic al multor clase de proteine este consecința directă a existenței structurilor terțiare, iar energia de legătură redusă a punților de hidrogen, face ca enzimele să fie ușor degradate termic, prin expunere la radiații sau prin

modificarea compoziției chimice a mediului de solvire a proteinelor respective.

Sub acțiunea unor factori fizici sau chimici proteinele pot suferi modificări de amploare mai redusă, parțial sau total reversibile denumite - *transconformații* sau modificări de mai mare amploare și ireversibile cunoscute sub numele de - *denaturări*.

De remarcat, că la acțiunea unor agenți fizico - chimici denaturanți ca: *temperatura* (55-60 °C), *pH-ul*, *concentrația ionică*, *presiunea*, *radiațiile electromagnetice și corpusculare*, se dezorganizează majoritatea legăturilor de hidrogen care asigură structura terțiară a multor enzime.

În cazul ribonucleazei, unde structura terțiară este asigurată de legături disulfurice, activitatea enzimatică este afectată abia la temperatura de 90 °C.

3.2. Proprietățile semiconductoare ale proteinelor

Dintre proprietățile fizice ale proteinelor, o poziție particulară o deține caracterul lor de *semiconductor*, determinat de electronii moleculari de tip π .

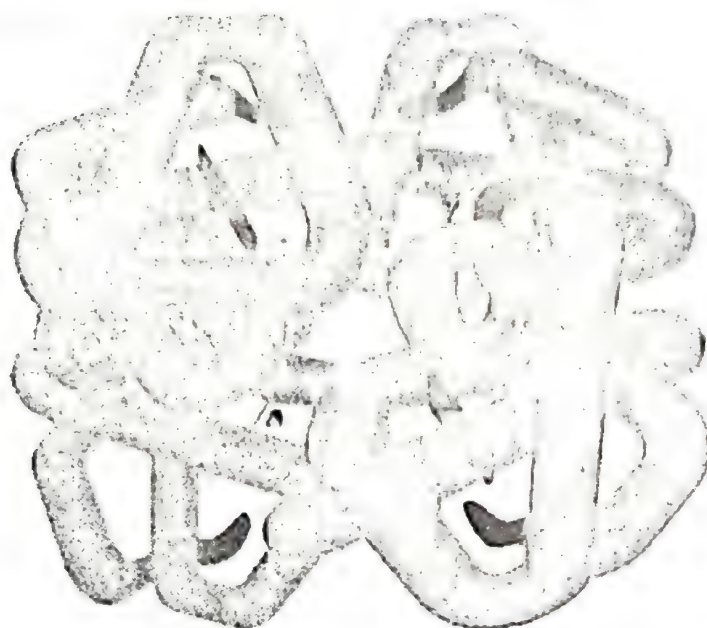


Figura 11. - Structura cuaternară a hemoglobinei din patru lanțuri peptidice (după M.F. Perutz citat de W. Hope și col. 1983)

Rezistența electrică a proteinelor în stare uscată variază cu temperatura conform legii:

$$R = R_0 e^{\frac{\Delta \epsilon}{2 k_B T}} \quad (1)$$

unde: k_B este constanta lui Boltzmann, R_0 este rezistența electrică extrapolată pentru $1/T$ tinzând la zero, iar $\Delta \epsilon$ este lărgimea benzii interzise ce separă banda de valență de banda de conducție (de ordinul a câțiva eV) (Figura 12).

Adsorbția apei la suprafața unor proteine modifică lărgimea benzii interzise, de exemplu de la 2,2 eV la 1,7 eV în cazul albuminei plasmatică. Acest fapt poate fi explicat prin prisma a două ipoteze: prima se bazează pe efectul de modificare, de către apă, a *constantei dielectrice* a proteinei, iar a doua presupune că adsorbția apei are efectul unei impurități.

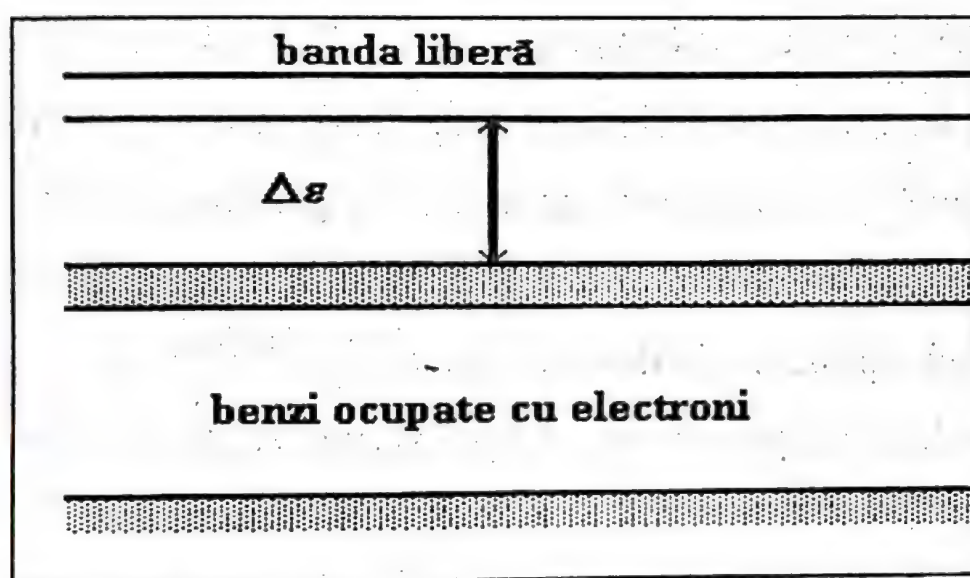


Figura 12. - Benzile energetice în proteine (Z. Simon și C. Nicolau 1976)

În orice caz, mecanismul semiconductibilității proteinelor este cel mai probabil, unul electronic și nu unul protonic.

S-a calculat că la nivelul grupărilor peptidice $C=O \dots HN$ legate între ele prin legături de hidrogen se generează trei benzi de energie cu lărgimea de 0,2 eV, dintre

care cele două inferioare sunt complet ocupate de electroni, iar cea superioară este liberă. Distanța dintre banda a doua ocupată de electroni și banda liberă este apreciată la 3,05 eV.

S-a evidențiat efectul grupărilor prostetice din proteine asupra lărgimii benzii interzise, arătându-se atât creșterea acesteia cât și diminuarea ei, ca urmare a cuplării acestor grupe de atomi. Astfel, hemul (gruparea prostetică a hemoglobinei) cuplat la globină produce scăderea valorii lui ΔE (de la 2,97 eV la 2,95 eV), sugerând că moleculele semiconductoare de hem sunt "îngropate" în cele relativ izolatoare de globină, ca și în cazul cuplării moleculelor de la acidul nucleic ADN, în partea proteică a nucleoproteinei izolate din timus.

La rodopsină, prezența retinalului (gruparea prostetică a rodopsinei) duce la creșterea lărgimii benzii interzise a opsinei, ceea ce ar presupune că electronii π ai retinalului pătrund în banda de conducție a proteinei, invers decât în cazul hemoglobinei.

Proteinele sunt molecule dipolare și amfolitice, ceea ce face ca în structurile membranare, de exemplu, să participe la interacțiuni electrostatice și ionice multiple.

Sinteza proteinelor de constituție ca și, de fapt, orice alt proces biochimic din celule, este controlată de proteinele

enzimatice a căror existență este determinată de informația genetică stocată în acizii nucleici.

3.3. Proprietăți enzimaticice

Rolul enzimelor de catalizatori ai reacțiilor metabolice poate fi ilustrat pe baza unui concept termodinamic fundamental pentru bioenergetica celulei cunoscută sub numele de *energie de activare*. Prin aceasta se înțelege faptul că moleculele reactante trebuie să aibă o energie minimă pentru a putea intra în reacția respectivă. Această energie, E , delimitată de două nivele energetice A și B , este necesară pentru declanșarea reacției, care decurge apoi spontan ca o reacție exoenergetică (proces exergonic, între nivelele A și C separate de energia internă ΔG) sau endoenergetică (proces endergonic).

Astfel este necesară depășirea unei anumite bariere energetice pentru declanșarea unei reacții biochimice ce se poate realiza, fie prin preluare temporară de energie (sub formă calorică, radiantă, ș.a.) din exterior, fie prin intervenția biocatalizatorilor (ex.: enzimele), care reușesc tocmai diminuarea barierei energice, de la o valoare E , prea mare

pentru intrarea în reacție, la o valoare E' care face reacția posibilă (Figura 13).

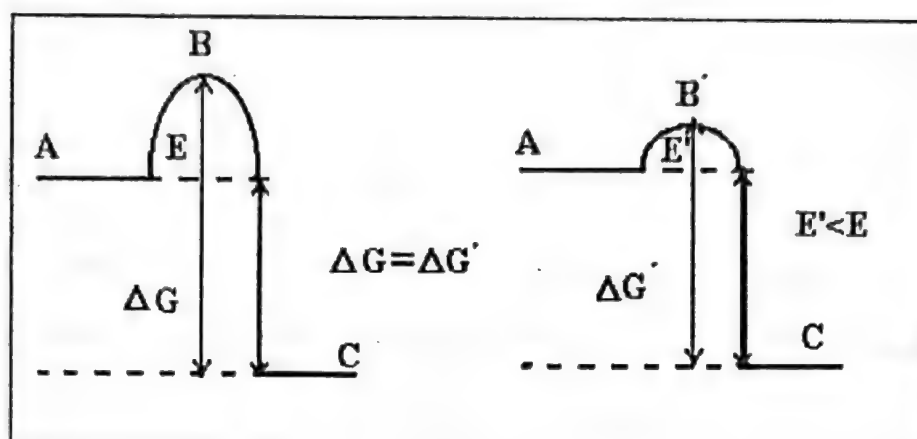


Figura 13. - Diminuarea energiei de activare de la E la E' la o reacție exergonică cu energia de reacție ΔG^* (după M. Isac 1987)

Prima cale este adesea neconvenabilă, căci necesarul de energie poate să fie prea mare, energizarea să nu fie economică sau să nu fie suportată de celulă. Acțiunea unor enzime specifice modificării substraturilor biomoleculare poate înlătura aceste neajunsuri, astfel ca celula să nu fie suprasolicitată energetic (Warren T.,1995)

Dacă energia unei reacții, ca de exemplu eliberarea de energie din compuși organici care sunt specializați în stocarea ei (cum ar fi degradarea glucozei până la dioxid de carbon și apă) este ridicată, atunci este necesar ca ea să decurgă în etape (Figura 14) pentru a asigura protecția celulei și eficiența

transformării. Fiecare etapă este caracterizată de o anumită energie de activare.

În decursul proceselor metabolice din celulă se produce nu numai eliberare de energie din moleculele care o stochează dar și acumulare de energie chimică prin reacții în care starea energetică finală este un nivel energetic superior celui inițial.

Declanșarea acestor procese endergonice se realizează pe baza *cuplajului* cu o reacție exergonică, ceea ce face posibilă existența fenomenelor biologice antientropice (consumatoare de entropie, prin care se trece de la o stare cu entropie mare într-o stare cu entropie mai mică, contrar tendinței de evoluție a sistemelor fizice). Cuplajul presupune existența unui *intermediar* cu rol de produs de reacție pentru unul din procesele cuplate și cu rol de reactant pentru celălalt proces.

Aproape fiecare reacție chimică dintr-o celulă este catalizată de o enzimă. Numărul reacțiilor enzimatice dintr-o celulă este foarte mare. De exemplu, într-o celulă animală există 1.000-4.000 de tipuri diferite de enzime (după J. Darnell, H. Lodish și D. Baltimore, 1990) fiecare catalizând o singură reacție sau un set de reacții chimice. Anumite enzime se găsesc în majoritatea tipurilor de celule, deoarece catalizează reacții celulare comune: sinteza proteinelor, a acizilor nucleici, a

fosfolipidelor, conversia glucozei și oxigenului în dioxid de carbon și apă, etc.

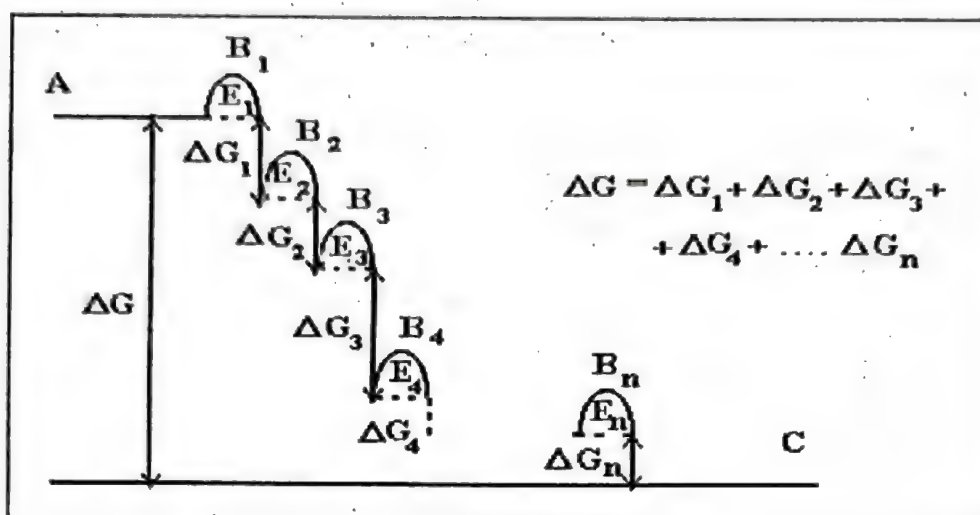


Figura 14. - Reacție exergonică derulată în etape, fiecare stare energetică intermediară fiind caracterizată de o energie de activare (modificat după M. Isac 1987)

3.4. Proprietățile structurale și de mediatori ai reacțiilor autoimune

Componentele glicoproteice, dar și cele glicolipidice (menționate în capitolul anterior), fac obiectul unei largi patologii autoimune (demielinizări mediate imunitar).

Implicarea proteinelor fibrilare citoscheletice (microtubuli, microfilamente și neurofilamente) în structurarea formei și integrității fibrelor nervoase, fac obiectul a numeroase studii.

Microtubulii, ca polimeri de tubulină sunt implicați în transportul axonal anterograd rapid, iar microfilamentele ca elemente de încastrare a constituenților membranari sunt de fapt polimeri de actină, atașați membranelor prin intermediul unor proteine submembranare (spectrină, ankirină, vinculină) sau transmembranare din familia integrinelor.

Proteinele transmembranare sunt asociate structurilor joncționale celulare “strânse” sau a celor de “ancorare”. Proteinele transmembranare din familia receptorilor de suprafață din grupul integrinelor intervin în acroșarea membranelor din rețeaua actină – spectrină. O astfel de configurație permite legarea, pe de o parte a citoscheletului la proteinele membranare (canale ionice, pompele Na^+/K^+ , molecule de adeziune de tipul alfa-actininei și vinculinei, etc.) și pe de altă parte, la interacțiunea filamentelor de actină cu proteinele matricei extracelulare de tipul colagenului de tip IV, laminina, proteoglicanul heparan sulfat - perlecanul, entactina, fibrina etc. (Cruce M. and all., 1997)

La nivelul joncțiunilor de aderență (intercelulare sau de tip celulă – matrice) s-au identificat proteine care aparțin moleculelor de adeziune calciu dependente intercelulare (caderine) sau intracelulară (alfa, beta, gamma-catenine,

vinculina, alfa-actinină și plakoglobulina – (Isac C.M. and all.,1999) .

În plus, rețeaua de actină - spectrină din membrana axolemică, formează o structură elastică deformabilă temporar constituind un sistem de protecție a fibrelor nervoase față de diverse solicitări mecanice (întinderi sau compresiile produse de mișcarea membrelor).

Structura mielinei compacte este dictată de o arhitectură proteică complexă, bogată în proteine (P_0 , P_1 , P_2 , PMP 22, etc.) a căror organizare și rol este încă incomplet elucidată, mai ales în patologia nervoasă .

Proteina P_0 este o glicoproteină transmembranară reprezentând 50% din proteinele mielinei și se pare că are un rol esențial în structurarea și stabilitatea mielinei conectă la straturile infra – și extracelulare.

Proteina P_1 (MBP) sau proteina bazică a mielinei, deși este o componentă în concentrație redusă (2 - 16%) este implicată în conectarea straturilor intracelulare la cele mielinice.

Proteina P_2 prezintă într-o concentrație de 1 – 15 %, pare să aibă un rol predominant metabolic și mai puțin structural.

Proteina P₂₂ (PMP-22) sau proteina mielinei periferice, se găsește într-o concentrație de 2 – 5 % din totalul proteinelor mielinice și ar putea juca un rol ca moleculă de adeziune între celula Schwann și axon, dar și în reglarea multiplicării celulare.

În mielina noncompactă au fost identificate câteva proteine ca *glicoproteina asociată mielinei (MAG)* cu rol de adeziune în compactarea mielinei și în declanșarea unor neuropatii demielinizante autoimune prin anticorpi anti - MAG.

Conexina 32 din regiunea paranodală și incizurile Schmidt – Lanterman ar juca un rol important în mielinizarea normală și schimburile axon – celulă Schwann, precum și în formarea joncțiunilor comunicante (gap) celulare mielinice.

De obicei, denumirea enzimei indică funcția sa: sufixul *-ază* - este adăugat denumirii tipului de moleculă asupra căreia acționează enzima. Astfel, proteazele degradează proteinele, fosfatazele înlătură reziduurile fosfat, ribonucleazele clivează moleculele de ARN (acid ribonucleic).

Există și enzime care se pot găsi numai într-un anumit tip de celulă, deoarece catalizează anumite tipuri de reacții specifice (de exemplu, cea neuronală).

Modul de acțiune al enzimelor, specificitatea, competitivitatea și caracterul de saturație al interacțiunilor enzimă - substrat pot fi cunoscute din cursurile de biochimie și

enzimologie, ceea ce vom aduce noi în atenția cititorului în cele ce urmează, fiind doar un punct de vedere cantitativ asupra cineticii reacțiilor enzimaticе, respectiv relația Michaelis-Menten.

CAPITOLUL 4

Proteinele contractile

Un aspect deosebit de interesant în biofizica moleculară și celulară îl reprezintă *mobilitatea celulară și contractilitatea*, a căror suporturi generatoare de forță sunt reprezentate de o întreagă gamă de structuri intracelulare, de natură proteică, grupate în două sisteme moleculare: **actină**, **miozină** și **dineină**, **tubulină**. Astfel de structuri intră în componența citoscheletului sub formă de microfilamente de actină, microtubi și centrioli.

În raport cu tipul și interacțiunea diverselor proteine contractile asistăm la producerea unei largi game de fenomene motrice de la mișcarea amoeboidală, flagelară sau ciliară, până la cele de endo – și exocitoză, migrarea cromozomilor la

nivelul fusului de diviziune sau a scurtării dimensiunilor citotisulare în cursul contracției musculaturii striate sau netede.

În celulele musculaturii striate (fibrele striate) se găsesc miofibrilele, organite intracelulare specifice alcătuite dintr-o succesiune de unități contractile numite *sarcomere*.

Sarcomerul conține proteine contractile structurate reprezentate de *miozină* (filamente groase, cu diametrul de 110 Å - Figurile 15 și 16) și *actină* (filamente subțiri, cu diametrul de 50 Å), precum și proteine reglatoare de tipul *tropomiozinei* și *troponinei* care la mușchiul neted este reprezentată de *calmodulină*.

Moleculele de miozină sunt formate din două elemente înfășurate în spirală și care se termină cu un cap globular. Miozina are forma unei baghete bifurcată la unul din capete, cu o lungime totală de 15 - 19 nm, o greutate moleculară de 480.000 Da și o structură formată din șase lanțuri din care două lanțuri grele (MHC), de *meromiozină* grea, la care se atașează câte două lanțuri de *meromiozină* ușoare (MLC).

Miozina prezintă capacitatea de a hidroliza molecula de ATP până la ADP și fosfat (P), precum și de a lega actina, la nivelul extremităților bifurcației.

Extremitatea activă enzimatică este denumită în literatura de specialitate segmentul S_1 (greutatea moleculară de

120.000 Da) continuată cu segmentul S₂ (greutatea moleculară 60.000 Da), ce împreună formează așa numita *meromiozină grea*. Restul moleculei (formă fibrilară) reprezintă *meromiozina ușoară* (greutatea moleculară de 150.000 Da) (Figura 15).

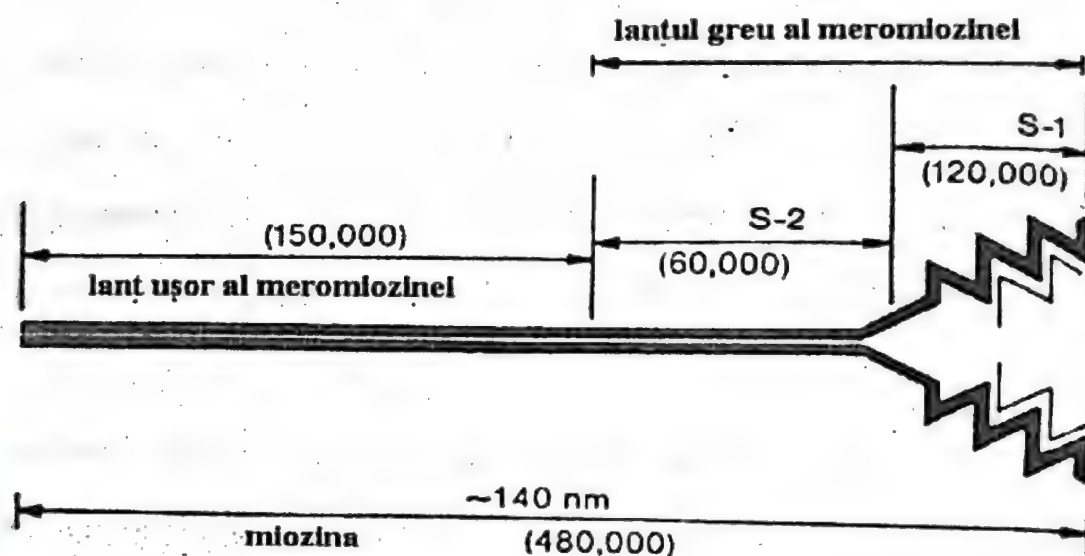


Figura 15. - Structura miozinei: lanțul greu (segmente laterale S1 și S2) și ușor de meromiozină. (după W. Hope și col. 1983)

Filamentul gros, de miozină este alcătuit din circa 400 molecule de miozină care își "împletesc" împreună porțiunile fibrilare nebifurcate, în timp ce segmentele S1 rămân în poziții excentrice, disponibile pentru cuplarea filamentelor subțiri în timpul contracției (Figura 16).

Actina constituie 60 % din masa filamentelor subțiri și este formată prin polimerizarea unor monomeri globulari - G

actina (Figura 17). Monomerul stabil numai în apă distilată, polimerizarea declanșându-se la creșterea concentrației ionice, când se constituie două lanțuri dublu spiralate - **F actina**, cu pasul elicei de 72 nm. Restul compoziției filamentelor subțiri

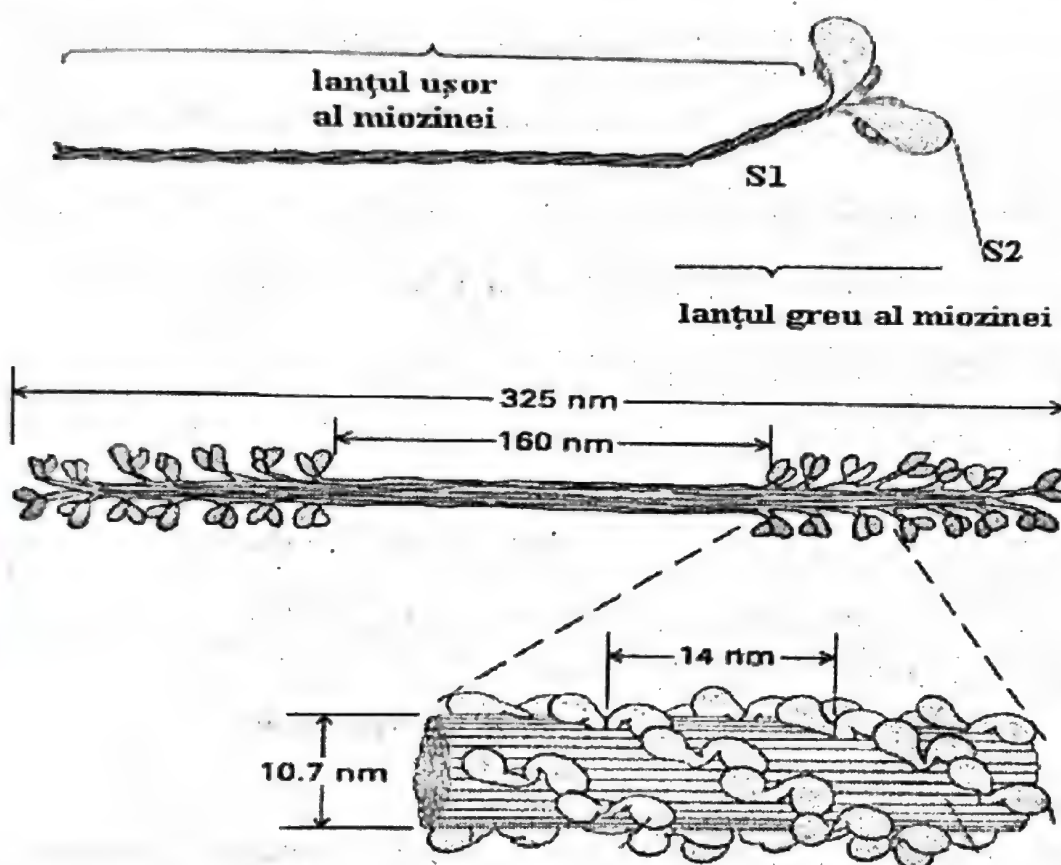


Figura 16. - Structura filamentului de miozină (după J. Darnell și col. 1990)

este reprezentat de *tropomiozina* și *troponina*, cu rol de proteine reglatoare.

Tropomiozina însoțește lanțurile de actină, ca un lanț spiralat paralel, iar troponina cu mare afinitate pentru calciu este atașată tropomiozinei la fiecare 38 nm lungime. Complexul

tropomiozină - troponină are rol reglator al contracției, în fibra musculară striată, în timp ce în fibra musculară netedă, rolul troponinei este suplinat de calmodulină .

Transformarea moleculei de ADP (prin fosforilare) în ATP este controlată de situsul ATP-azic al miozinei - la nivelul căruia are loc hidroliza ATP-ului și cuplarea miozinei cu actina în timpul contracției (Figura 18). Actina este întâlnită și în constituția citoscheletului molecular (vezi în capitolul dedicat celulei eritrocitare).

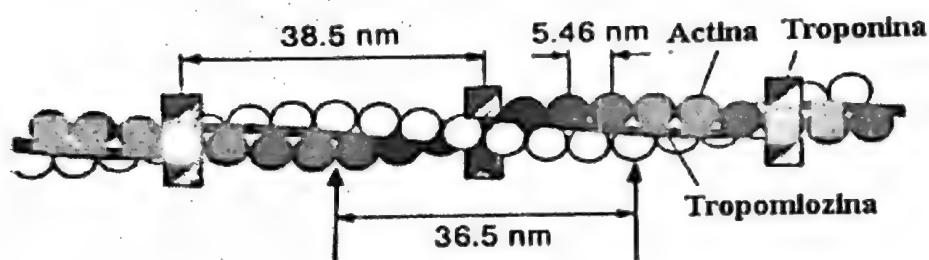


Figura 17. - Structura filamentului de actină presupune prezența și interacțiunea actinei cu troponina și tropomiozina (W. Hope și col. 1983)

După cum se va vedea în capitolul dedicat structurii citotissulare musculare, contracția constă din scurtarea lungimii sarcomerilor (Figura 18), prin alunecarea filamentelor subțiri printre filamentele groase (conform modelului filamentelor glisante al lui Huxley, 1957). Singura modificare conformațională în timpul contracției, fiind cea corespunzătoare

unghiului dintre segmentul S1 și segmentul S2 al actinei, (conform modelului lui Huxley și Simmon, 1971), (M. Isac și R. M. Isac 1983, 1985, 1986, 1987, 1988, 1990, 1991, 1992; I. Haulică și F. Topoliceanu, 1989)

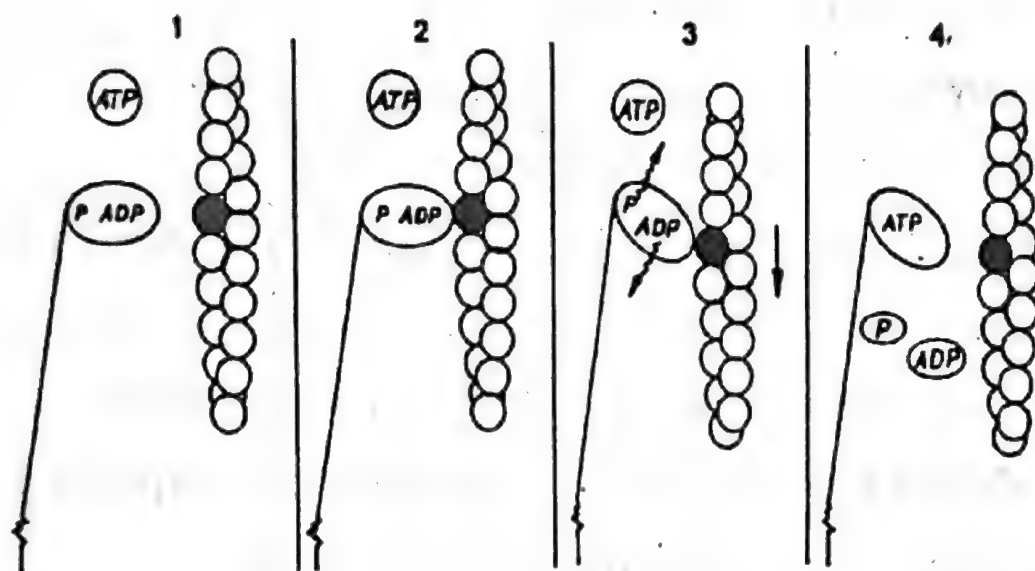


Figura 18. (1) - Formarea complexului actomiozinic presupune transformări ale sistemului ADP - ATP; (2) - Cuplarea miozinei cu actina; (3) - Modificarea cu circa 45° a unghiului dintre segmentele S1 și S2, concomitent cu scindarea ATP - ului în ADP și fosfat (sub controlul situsului ATP - azic al segmentului S2); (4) - Decuplarea presupune intervenția altei molecule de ATP (J. Darnell 1990)

CAPITOLUL 5

Elemente de biofizica hemoglobinei

Hemoglobina este un constituint major al hematiilor, celulele care dețin ponderea principală în compoziția sângelui asupra căruia câteva referințe le considerăm utile.

Sângele constituit din două faze, **plasma** și **elementele figurate**, este un fluid complex, care împreună cu limfa și lichidul interstițial formează mediul intern al organismului.

Sângele reprezintă 6 - 8% din greutatea corporală și conține elemente figurate în proporție de 40 - 45%.

Principalele elemente figurate sunt:

- *eritrocitele* (99%)
- *leucocitele* (celulele albe) ✓ granulocite (65%);
✓ limfocite (30%);
✓ monocite (5%);
- *plachete* (trombocite).

Plasma sangvină este alcătuită din 90% apă și 10% reziduuri uscate, din care 9% substanțe organice și 1% substanțe anorganice).

Substanțele organice sunt: proteine (albumina, globulinele, fibrinogenul ș.a.), lipide (colesterol, fosfolipide, ș.a.), glucide (glucoza, ș.a.), acizi organici (acid lactic, acid citric, ș.a.), pigmenți serici (bilirubina, urobilinogenul, ș.a.), enzime (amilaza, lipaza, fosfataza alcalina, ș.a.), vitamine (A, D, E, PP, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, ș.a.) și hormoni (estrogeni, corticoizi, ș.a.).

Substanțele anorganice sunt: sodiul, potasiul, calciul, magneziul, fierul, cuprul, zincul, manganul, clorul, acidul carbonic, ionul sulfat, bromul, iodul, fluorul, etc.

5.1. Structura și funcțiile hemoglobinei

În situațiile fiziologice normale **hemoglobina**, prezentă în citoplasma celulelor roșii ale sângelui (eritrocite - hematii) reprezintă o treime din greutatea celulei. La fiecare 194 de zile toată cantitatea de hemoglobină se reînnoiește, fiind sintetizată la nivelul măduvei osoase și în ficat (în organismul adult, rolul ficatului este mult mai puțin important decât pentru embrion). În procesul de hemoliză, hemoglobina este degradată până la bilirubină, care se excretă în căile biliare și se elimină din organism sub formă de stercobilinogen și urobilinogen.

Comparativ cu alte componente ale sângelui, greutatea moleculară, mărimea și forma moleculei de hemoglobină pot fi urmărite în Tabelul 5 și Figura 19.

Tabelul 5. Greutățile moleculare și dimensiunile maxime ale hemoglobinei și ale altor biomolecule (modificat, după F. Gremy și J. Perrin, 1975)

Molecula	Greutatea moleculară (da)	Dimensiunea maximă (angstrom)
Uree	60	4
Hemoglobină	68.000	42
ADN	10.000.000	10.000.000 (1 micron)

Hemoglobina este din punct de vedere chimic o cromoproteină, cu o greutate moleculară de 64.500 Da, formată din patru lanțuri polipeptidice, fiecare din acestea conținând un component de tip pigment denumit *hem*. Fiecare din cele patru grupe ale hemului sunt protoporfirine cu ioni bivalenți de fier plasați central. Fiecare structură protoporfirinică se compune la rândul ei, din patru inele pirolice legate prin punți metinice. Componenta proteică este formată din patru lanțuri polipeptidice individuale care conțin mai mult de 140 resturi de aminoacizi.

Arhitectura spațială a acestei molecule a fost deja elucidată într-o mare măsură prin analiza tridimensională de difracție cu raze X.

Hemoglobinele izolate de la diferite specii de animale conțin *globine* diferite (partea proteică), dar aceeași grupare prostetică - *hemul*.

Structura hemoglobinei, asemănătoare cu a clorofilei, se bazează pe un nucleu porfirinic, tetrapirolic, centrat pe un atom de fier(hemul), la care se leagă partea proteică, globina, care poate să difere de la o specie la alta (Figura 20).

Globina se atașează la atomul de fier din centrul hemului, aproximativ perpendicular pe planul hemului de o parte, iar de cealaltă parte legându-se oxigenul, dioxidul de carbon, etc. Nucleul porfirinic conține 20 de atomi de carbon și 4 atomi de azot; la hemoglobină (hemoglobină, oxihemoglobină, carboxihemoglobină, etc.) în centrul nucleului molecular porfirinic este legat un atom de fier; iar la moleculele de clorofilă (clorofila **a**, clorofila **b**, clorofila **c**) în centrul acestui nucleu este plasat un atom de magneziu iar în cazul vitaminei B₁₂ (cian - cobalamina) se află un atom de cobalt, după cum au confirmat studiile bazate pe difracția razelor X.

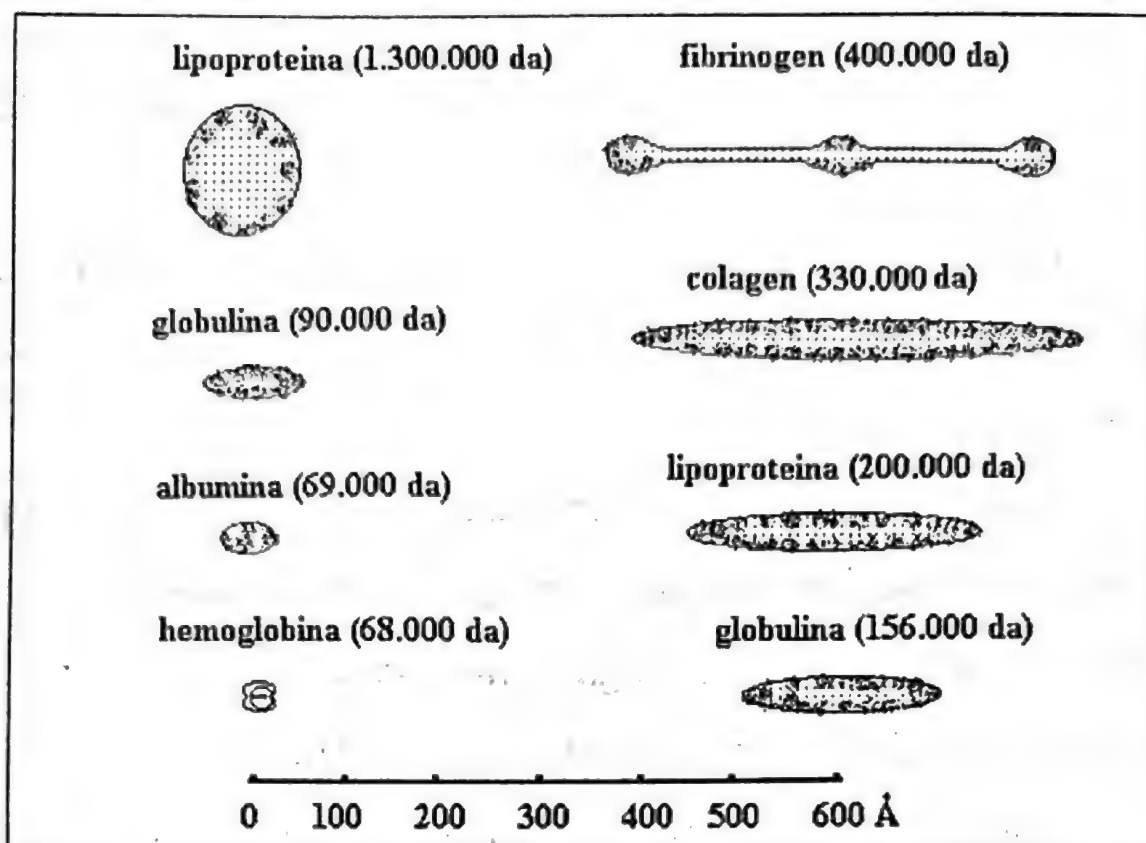


Figura 19. - Greutăți moleculare și dimensiuni maxime ale hemoglobinei și ale altor biomolecule (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

O altă reflectare a structurilor similare ale hemoglobinei și clorofilei (deși aceasta din urmă nu este o proteină) este dată de asemănările proprietăților optice ale produșilor lor de degradare, respectiv hematoporfirina și etioporfirina.

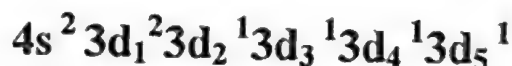
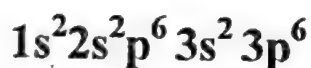
Caracterul feromagnetic al atomului de fier favorizează observarea fenomenului Mossbauer (absorbția și emisia rezonantă a radiațiilor gamma) fapt ce a constituit obiectul a numeroase studii efectuate în anii 1970 - 1980 de May, Lang și Marshall, atât pe hemoglobină cât și pe citocromi (structura de

hem fiind prezentă și în unele enzime ale lanțului respirator din mitocondrii, cum sunt citocromii).

Caracteristicile spectrului Mossbauer sunt sensibile la legăturile interatomice pe care le realizează fierul și pot da informații despre structurile electronice și de ligand din jurul atomului de fier (Figura 21).

Atomul de fier din centrul hemului este hexacoordinat, patru dintre valențele sale de coordinație fiind satisfăcute de cele patru inele pirolice, a cincea putând lega o moleculă de apă iar a șasea - o moleculă de gaz (oxigen, dioxid de carbon).

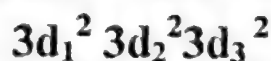
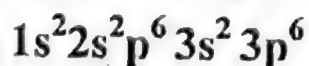
Proprietățile feromagnetice ale hemului sunt rezultatul configurației electronice a fierului din compoziția sa. Fierul atomic are următoarea configurație electronică:



18 electroni pe straturile interne

8 electroni periferici

În schimb, fierul dublu ionizat are configurația:



Aceasta înseamnă că îi rămân trei orbitali electronici **4p** liberi pe ultimul strat, împreună cu doi orbitali **3d** și cu un orbital **4s**.

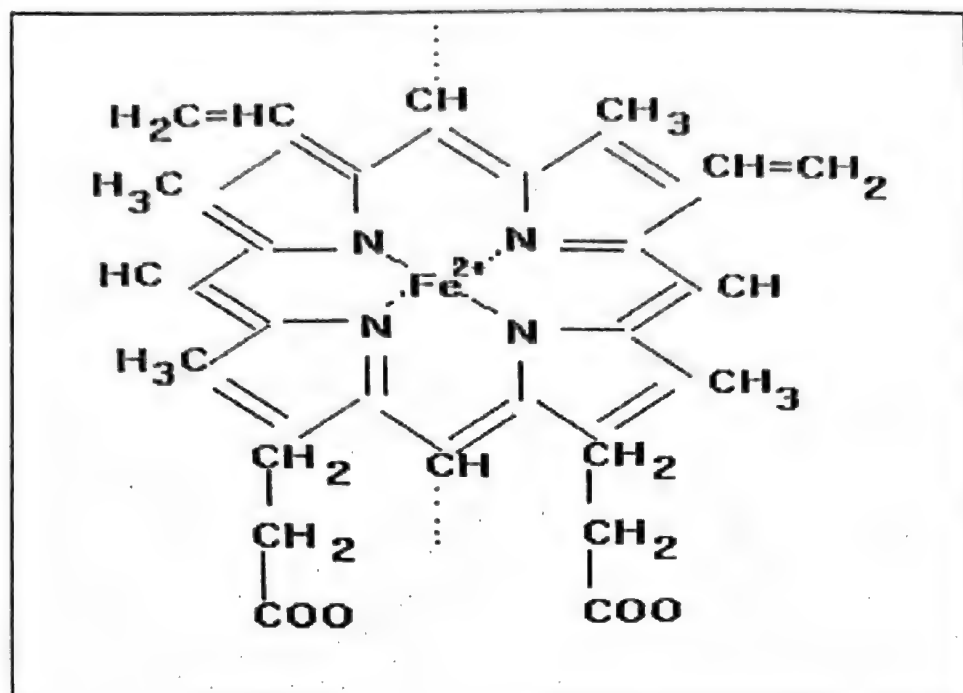


Figura 20. - Structura hemului cu atomul de fier dublu ionizat în centrul planului, având patru din cele șase valențe satisfăcute de atomii de azot din cele patru inele pirolice și cu două valențe libere pentru cuplarea globinei și a unui ligand (după Schmidt 1989)

Fiecare din aceștia poate fi ocupat cu câte doi electroni pe care fierul îi acceptă de la alți atomi sau grupe de atomi, deci valența fierului atomizat este egală cu șase și se realizează cu participarea a 12 electroni de la atomii învecinați cu fierul.

Hemoglobina poate fi analizată spectral (Figura 21) în mod direct, cu aparatura spectrală pentru domeniul vizibil (care este mai accesibilă decât cea pentru ultraviolet, care necesită fibră optică din cuarț): spectroscopie sau spectrofotometre cu echipament pentru vizibil, căci hemul absoarbe în spectrul

vizibil, în domeniul verde - gălbui (complementar domeniului roșu pe care îl reemite).

Alte cromoproteide cu funcții respiratorii și cu structură porfirinică (conținând de asemenea, fier) sunt citocromii, catalazele, peroxidazele, ș.a., iar neporfirinice sunt, de exemplu, enzimele flavinice și hemocianinele din organismul melcilor și moluștelor (conținând cupru).

Cromoproteide fără funcție respiratorie sunt clorofilele, ficocianinele și ficoeritrinele din algele roșii și albastre (cu structură porfirinică) și carotenproteidele ca purpurul retinian, rodopsina, ș.a., (fără structură porfirinică).

Hematiile mature nu au capacitatea de a sintetiza hemoglobină și-au pierdut mitocondriile și ARN -ul, spre deosebire de hematiile foarte tinere care pot sintetiza hemoglobina din precursorii proteici ai globinei concomitent captării fierului prin intermediul unei proteine de legătură (o proteină specifică, transferina sau siderofilina, care transportă fierul prin membrana hematiilor imature).

În mod normal, legarea moleculelor de oxigen, monoxid de carbon, dioxid de carbon, la atomul de fier trebuie să confere o stabilitate suficientă noului compus pentru a putea fi

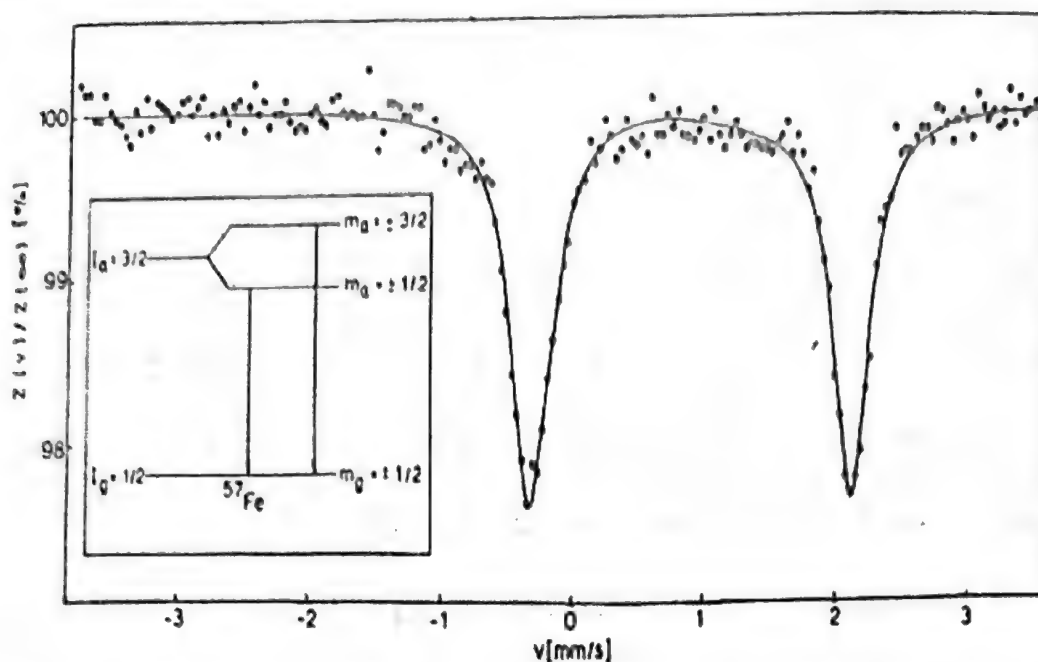


Figura 21. - Spectrul Mossbauer al dezoxihemoglobinei umane prezintă două picuri ca urmare a despicării nivelului energetic caracterizat de numărul cuantic nuclear $I_a=3/2$ datorită existenței unui moment magnetic de cuadrupol al atomului de fier (două valori ale numărului cuantic magnetic $m_a=3/2$ și $m_a=1/2$ desemnează cele două subnivele energetice ale nivelului caracterizat de $I_a=3/2$) (după W. Hope și col. 1983)

transportat de la un țesut la altul iar, pe de altă parte, legătura trebuie să aibă un caracter reversibil pentru ca după atingerea punctului terminal al transportului, moleculele ligand să se poată elibera de hemoglobină.

Hemoglobinopatiile sunt afecțiuni legate de existența hemoglobinelor anormale, cu oxigenul legat prea puternic sau prea slab la atomul de fier. Este cazul anemiei falciforme (V. Rusu și C. Brănișteanu, 1987) când, din cauza insuficienței oxigenului, hemoglobina din hematii precipită și hematia se deformează luând aspect de seceră. Consecința este creșterea

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

rigidității și scăderea deformabilității la trecerea prin capilare ceea ce duce la distrugerea membranelor eritrocitare (hemoliză) și în final, scăderea cantității de hemoglobină care înseamnă anemie.

Tehnicile spectrale bazate pe difracția razelor X au evidențiat în cazul anemiilor falciforme o concentrație sporită de ioni de calciu acumulat în hematiile modificate.

În cazul *corpilor Heinz* avem de-a face cu precipitarea hemoglobinei denaturate sub formă de corpusculi, la pacienți tratați anterior cu mari cantități de antioxidanți (sulfamide, antimalarice, etc.) care au perturbat fixarea oxigenului. Aceste precipitate se atașează de membrana hematiei și îi sporesc rigiditatea, astfel că la trecerea prin structura sinuoasă arterială splinică, hematia este reținută și scoasă din circuitul sangvin înainte de împlinirea duratei normale de viață. Reducerea numărului de hematii determină apariția anemiei cu manifestări severe uneori.

Studii asupra conductibilității electrice a hemoglobinei au evidențiat caracterul de semiconductor al acestei molecule, curbele de variație cu inversul temperaturii, al logaritmului rezistenței electrice, prezentându-se ca niște drepte. În prezența adsorbanților conductibilitatea se modifică - crește odată cu scăderea constantei dielectrice (permitivității electrice) a

adsorbanților: H_2O , D_2O (apa deuterată), CH_3OH confirmând ipoteza efectului de impuritate al acestor molecule asupra semiconductorului pe care îl constituie hemoglobina.

De un interes deosebit pentru funcția respiratorie și rolul hemoglobinei în transportul gazelor respiratorii (O_2 și CO_2), sunt studiile și datele referitoare la capacitatea de fixare și disociere a acesteia, în condiții de efort hipo – și hiperbaric (F.Topoliceanu și col., 1972) și rolul de sistem tampon al acestuia în homeostazia bazică a mediului intern.

Aceste aspecte sunt dezvoltate și fac obiectul cercetărilor de biofizică, biochimie, fiziologie sistemică respiratorie ale efortului și recuperării funcționale cardio-respiratorii (Apostol Ion și col., G. Pandelescu și col.; Avram și F. Topoliceanu, 1995).

CAPITOLUL 6

Molecule macroergice

Moleculele macroergice din celulele organismelor vii au rolul de stocare a energiei provenită din procese metabolice de internalizare a energiei din exteriorul organismului (din degradarea alimentelor sau din fluxul energetic solar cum este cazul ATP la plantele autotrofe). Aceste tipuri de molecule au și capacitatea de a elibera energia înmagazinată când procesele metabolice consumatoare de energie o cer.

În lumea vie se cunosc mai multe tipuri de compuși macroergici (Tabelul 6), care înmagazinează energie chimică la nivelul unor legături interatomice cum sunt:

- legăturile hidrolizabile de tip P-O, care sunt și cel mai des întâlnite, (legăturile P-O apar în cadrul grupărilor pirofosfat, acil-fosfat și fosfofenol);
- legăturile hidrolizabile S-C, întâlnite mai rar, de exemplu în cadrul grupării tioester, prezentă la unul din metaboliții cei mai importanți - acetilcoenzima A.

- legăturile hidrolizabile P-N, destul de rare, prezente în molecula de fosfagen (sau fosfocreatina).

Cel mai caracteristic compus macroergic este acidul adenzintrifosforic - ATP care prin hidroliza unei grupări fosfat trece în ADP - acid adenzindifosforic.

Tabelul 6. Energiile ΔG degajate prin hidroliza unor compuși cu fosfor (după M. Isac 1987)

Compus fosforilat	P - enolpiruvat	Glucozo-1-fosfat
$\Delta G(\text{cal/mol})$	12800	5000
Compus fosforilat	1,3-di-P-glicerat	Fructozo-6-fosfat
$\Delta G(\text{cal/mol})$	11800	3800
Compus fosforilat	P-creatină	Glucozo-6-fosfat
$\Delta G(\text{cal/mol})$	10500	3300
Compus fosforilat	Acetil - P	3-P-glicerat
$\Delta G(\text{cal/mol})$	10100	3100
Compus fosforilat	ATP	Glicerol-1-P
$\Delta G(\text{cal/mol})$	7000	2300

Molecula de ATP prezintă încărcare electrică (patru sarcini negative localizate pe legătura fosforică), toate cele

patru grupări fosfat fiind dissociate în condițiile pH-ului neutru (7,0) din citoplasma celulară.

Stabilitatea compusului macroergic ATP este dată și de interacțiunile între două grupări fosfat negative monovalente cu un ion bivalent de calciu sau magneziu.

Din punct de vedere electrostatic măsura energiei stocate în această moleculă este dată de cea a energiei electrostatice a complexului de sarcini electrice negative, energie de respingere care este compensată la nivelul energiei interne a compusului stabilizat, în care cele patru sarcini sunt menținute în apropiere una de alta (Figura 22).

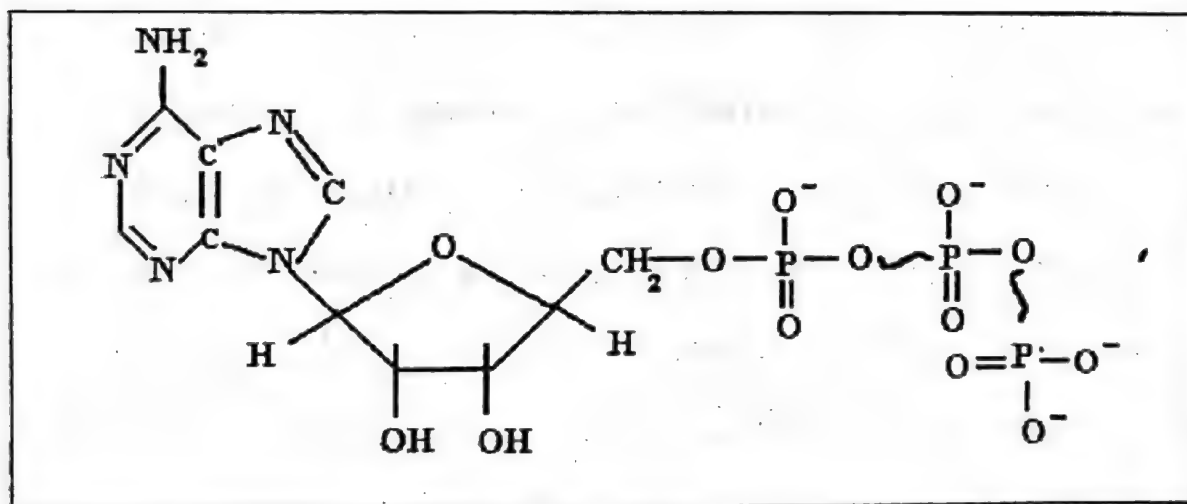


Figura 22. - Structura moleculei macroergice de ATP (acid adenzintrifosforic)

Reacția reversibilă $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP}$ joacă rolul unei baterii energetice celulare care se încarcă prin fosforilarea ADP și se descarcă prin hidroliza ATP:



ATP este direct implicat în multe procese energetice din celulă, cum sunt: glicoliza, fosforilarea oxidativă, fotofosforilarea. Acesta este prezent în toate tipurile de celule animale și vegetale din scara filogenetică. ATP se poate transforma în AMP ciclic (cAMP) având rol în semnalizarea și deci în comunicarea celulară.

Guanozintrifosfatul (GTP) are un rol asemănător ATP-ului (de stocare de energie celulară), iar cGMP este întâlnit în semnalizarea celulară la nivelul suitei mesagerilor secundari.

Transportul activ transmembrantar, contracția musculară și bioelectrogenera sunt doar câteva din fenomenele biofizice în care astfel de biomolecule sunt evident, indispensabile (F. Topoliceanu și col. 1971; F. Topoliceanu și col. 1972; F. Topoliceanu și col. 1974; M. Isac și R. M. Isac 1984; M. Isac și R. M. Isac 1985; M. Isac și R. M. Isac 1988).

CAPITOLUL 7

Enzimele lanțului respirator

Majoritatea covârșitoare a celulelor sunt dotate cu *mitocondrii*, organite celulare care asigură conversia energiei în forme care pot fi utilizate pentru desfășurarea reacțiilor chimice din celulă. La nivelul *membranei interne* mitocondriale există un procentaj semnificativ de proteine (circa 70%) cu *proprietăți enzimatică*. Acestea sunt baza moleculară a proceselor de *transport de electroni* prin care se convertește energia eliberată în reacțiile de oxido-reducere spre forme convenabile de stocare, mai ales în molecule macroergice de tip ATP (*fosforilarea oxidativă*). Tot la acest nivel este localizat un număr însemnat de enzime, care catalizează diverse alte reacții celulare.

Enzimele lanțului respirator cum mai sunt denumite proteinele implicate direct în reacțiile de *oxido - reducere* - mai ales a glucidelor și acizilor grași, asigură degradarea totală a piruvatului și acizilor grași, în prezența oxigenului, până la bioxid de carbon și apă.

În lipsa acestora, energia provenită din degradarea glicolică (cum se întâmplă, de exemplu în celulele eritrocitare adulte și în celulele maligne) este caracterizată de un randament mult mai coborât: numai 2 molecule de ATP se pot sintetiza pentru fiecare moleculă de glucoză și nu 36, ca în cazul fosforilărilor oxidative.

Preocupări ale biofizicienilor ieșeni pentru investigații experimentale asupra unor procese bioenergetice din organismele animale, s-au axat pe modificări enzimatice induse de unele substanțe toxice administrate șobolanilor de laborator (R. M. Isac și M. Isac, 1982) ca și pe acțiunea unor câmpuri magnetice asupra fosforilărilor oxidative din creierul acestor organisme (P. Jitariu și M. Isac 1968).

În mod analog, la nivelul proteinelor din *membranele cloroplastelor* (organite celulare specifice plantelor verzi) se realizează conversia energiei, inițial cea electromagnetică din spectrul vizibil al radiației solare, apoi cea din degradarea glucidelor și acizilor grași, în formele utilizabile pentru desfășurarea celorlalte reacții celulare.

Avem de-a face cu un cuplaj chemo - osmotic, în cadrul căruia *donori de electroni* bogați în energie (rezultată din degradarea alimentelor, sau utilizarea radiației solare), o transferă treptat unui lanț de molecule transportoare de

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

electroni, având ca rezultat *pomparea protonilor* din interior spre exteriorul membranei interne (în matrix) și generarea unui *gradient electrochimic transmembrantar* de protoni (Figura 23). (Într-unul din capitolele următoare se va vedea că un astfel de gradient, presupune o componentă chimică - diferență de concentrație, precum și o componentă electrică - diferență de potențial electric). În baza acestei energii sunt catalizate o serie de reacții controlate de către enzimele membranare.

La mitocondrii și cloroplaste o parte semnificativă din energia internă din celulă este destinată fosforilării ADP-ului până la ATP (sub controlul unei ATP - sintetaze). Aceste aspecte bioenergetice se întâlnesc atât la eucariote cât și la procariote.

Procariotele sunt prevăzute cu membrane bogate în proteine enzimatică și internalizează energia eliberată din oxidarea substanțelor hrănitoare luate din mediul extern stocând-o însă în mod preferențial, în gradientul de potențial electrochimic protonic, convertită ulterior, între altele și pentru *locomoția* în mediul ambiental.

Mecanismul fosforilării oxidative (Figura 24) este susținut de *trei complexe enzimatică* (trei ansamble de proteine respiratorii - Figura 25).

Cel mai remarcabil colector de electroni de mare energie proveniți din degradarea oxidativă a alimentelor este NADH. Fiecare astfel de moleculă captează câte un ion negativ de hidrogen, adică un atom neutru de hidrogen la care se atașează un electron. Într-o primă etapă a transportului de electroni, NADH revine la forma de NAD^+ prin eliberarea unui proton și a doi electroni.

NADH - dehidrogenaza este principalul component al primului și celui mai mare complex enzimatic al lanțului respirator. Electronii eliberați de el, trec la un centru flavinic de dezenergizare și apoi sunt dirijați către cinci centre cu fier și sulf spre o moleculă mică de ubiquinonă (sau CoA) unde pierde treptat, alte diferite cantități din energie inițială. Această moleculă este de mici dimensiuni și are mare mobilitate în membrană.

În al doilea complex enzimatic respirator (complexul de citocromi $b-c_1$), electronii eliberați de ubiquinonă trec la citocromul c din dimerul $b-c_1$ (fiecare monomer conține trei grupări de tipul hemului legate la citocromi și o proteină cu fier și sulf). Citocromul c este o proteină mică din planul periferic al membranei.

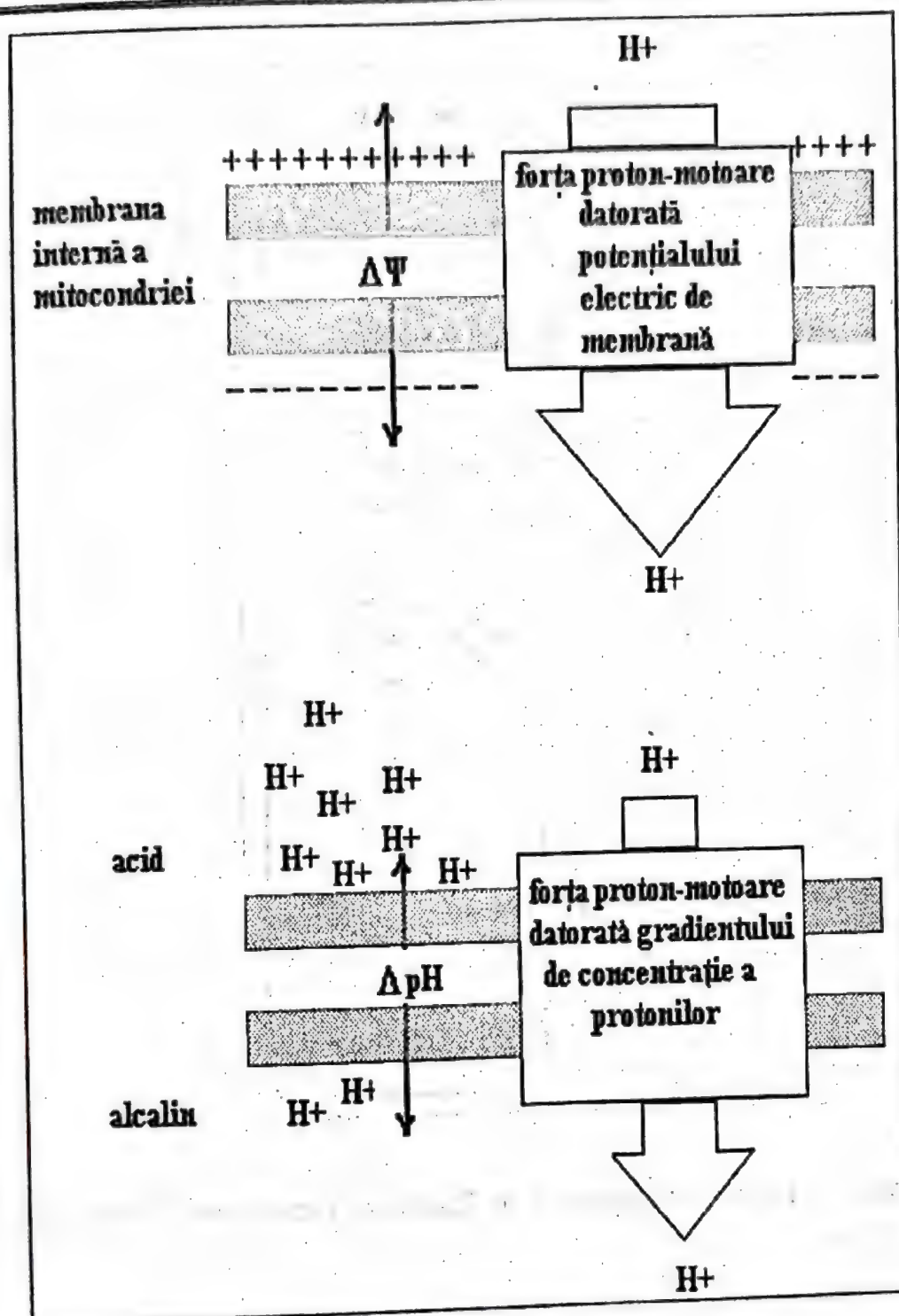


Figura 23. - Cele două componente ale gradientului electrochimic protonic (după Alberts și col. 1989)

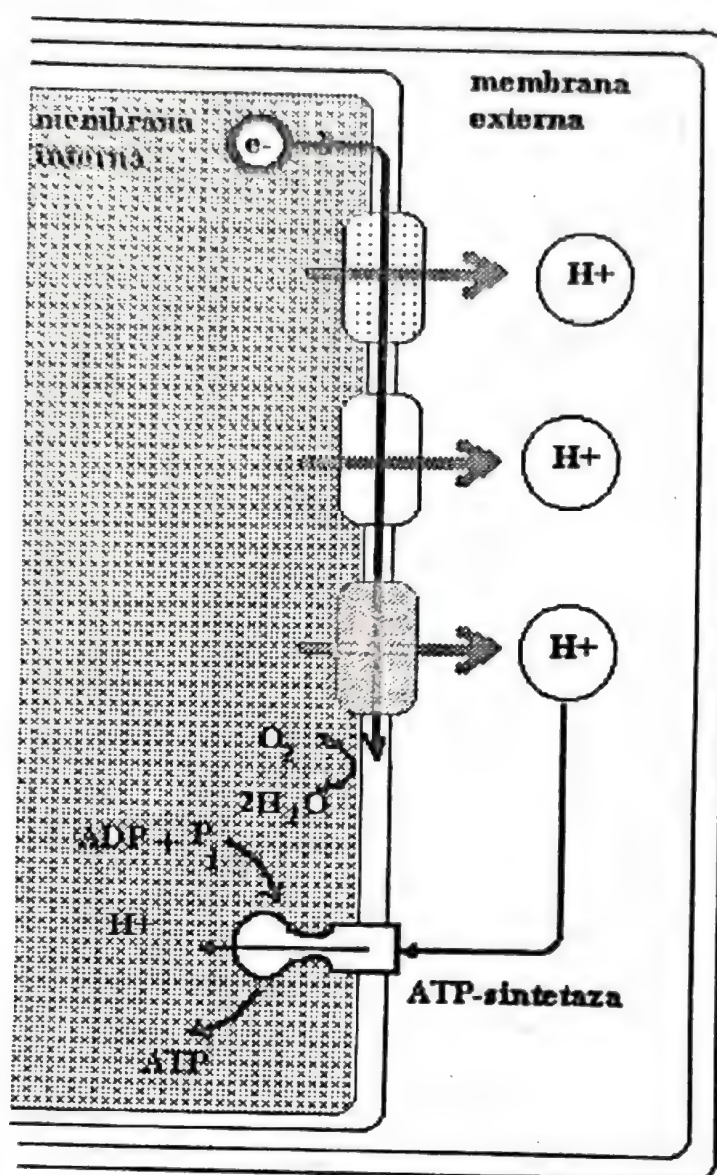


Figura 24. - Mecanismul general al fosforilării oxidative (modificat după Alberts și col. 1989)

În al treilea complex enzimatic – (Figura 25) complexul citocrom-oxidativ - bazat pe citocromi aa_3 , electronii eliberați de citocromul c sunt dirijați, în final, spre oxigen. Acest complex enzimatic este și cel mai bine cunoscut. El se prezintă

ca un dimer, fiecare din cei doi monomeri conținând doi citocromi și doi atomi de cupru.

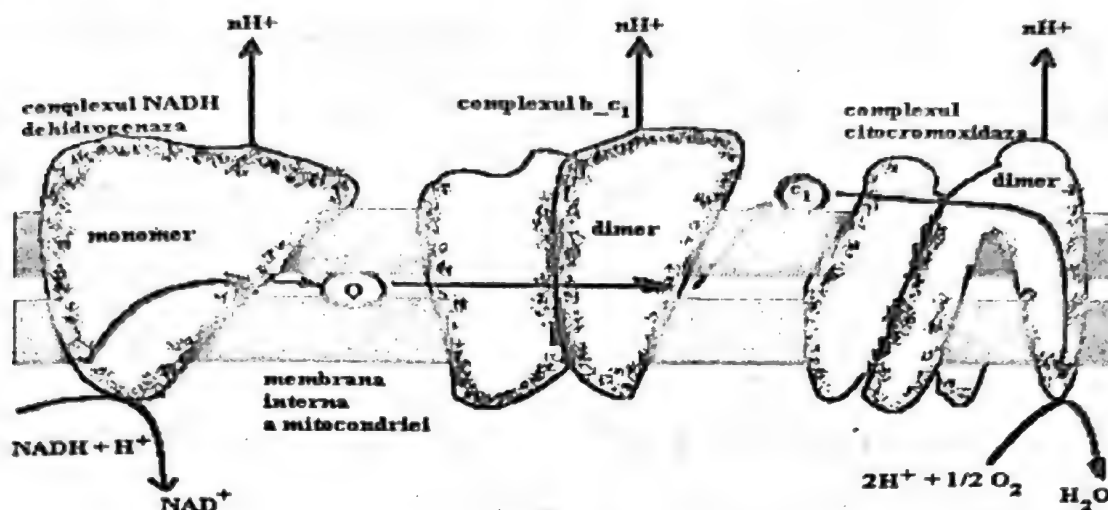


Figura 25. - Cele trei complexe enzimatice constitutive ale lanțului respirator: Q = ubiquinona iar c_1 = citocromul c_1 (modificat după Alberts și col. 1989)

Cele trei complexe enzimatice pot fi considerate ca niște entități separate ale membranei interne fără a li se atribui o structurare ordonată care să explice transportul electronilor căci acest transport se poate explica prin marea mobilitate a *ubiquinonei* și *citocromului* c_1 ce difuzează cu rapiditate în planul membranei.

Coliziunile acestor componente de mare mobilitate cu componentele adiacente din complexe enzimatice ale lanțului respirator pot explica vitezele mari cu care sunt transportați electronii (la fiecare 5-20 milisecunde un electron este trecut de la un complex enzimatic la următorul).

Investigațiile cantitative au arătat că enzimele lanțului respirator sunt prezente în proporții diferite atât, în cele trei complexe respiratorii cât și în membranele mitocondriale interne la diferite tipuri de celule având un rol privilegiat în geneza gradientelor electriochimice și surselor energetice implicate în transportul activ transmembrantar (F. Topoliceanu 1974; F. Topoliceanu și col. 1977; F. Topoliceanu și col. 1984; F. Topoliceanu 1988; M. Isac și R. M. Isac 1985; M. Isac și R. M. Isac 1986; R. M. Isac și col. 1997).

Astfel, în celulele musculaturii cardiace (B. Alberts și col. 1990), la fiecare moleculă de NADH dehidrogenază corespund trei molecule de complex *b-c₁*, șapte molecule de citocromoxidază, nouă molecule de citocrom *c₁* și 50 molecule de ubiquinonă.

Direcția prestabilită pentru transportul electronilor în lungul lanțului de transportori este determinată de creșterea potențialului redox dinspre NADH către oxigen - cele două extremități ale lanțului respirator (Figura 26). Potențialul redox este o măsură a afinității pentru electroni a fiecărei perechi conjugate redox: cum este NADH cu NAD⁺ sau H₂O și 1/2 O₂ și care se poate evalua practic - în principiu - utilizând o pereche de electrozi imersați în soluțiile ce conțin componentele unei perechi redox.

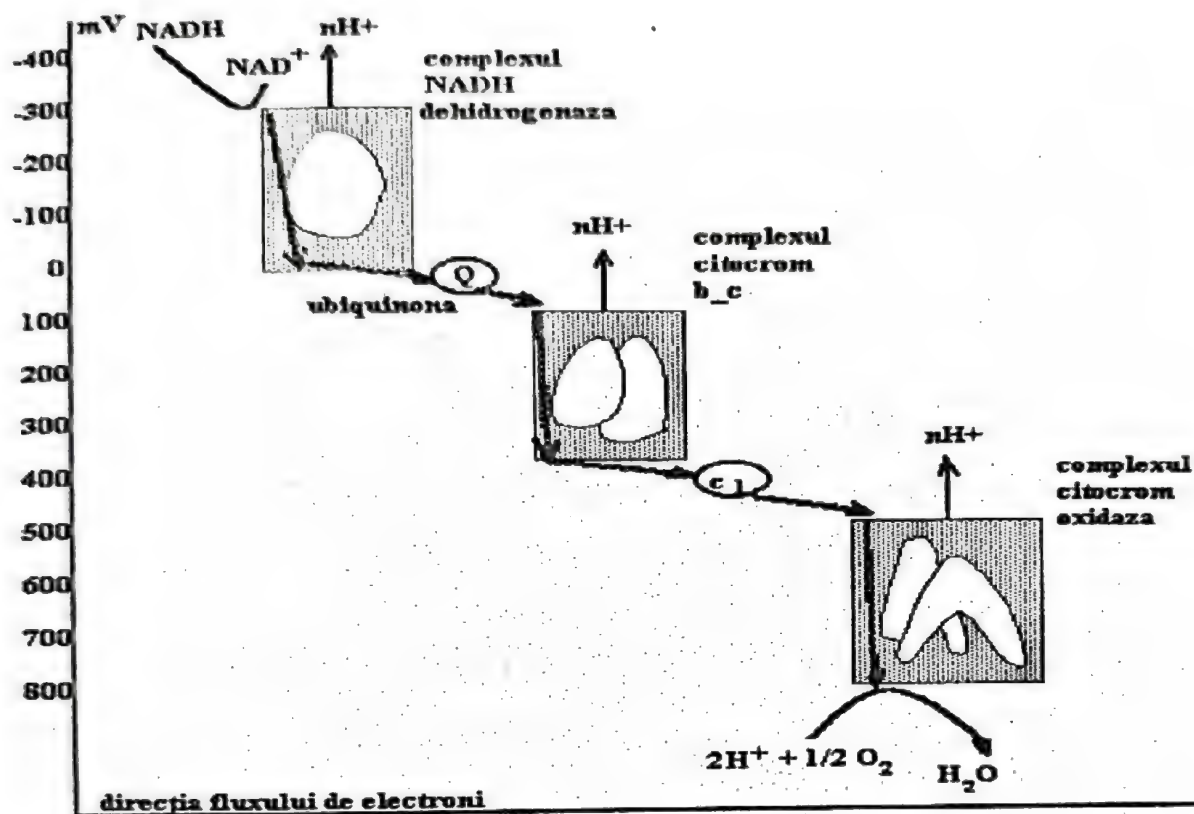
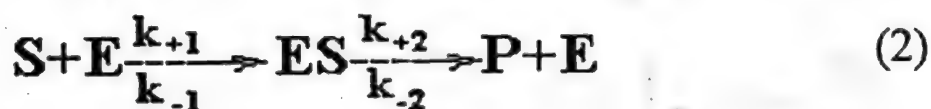


Figura 26. - Variația potențialului redox (mV) în lungul lanțului respirator. Ubiquinona este notată cu Q iar citocromul c_1 cu c_1 (Alberts și col., 1989).

CAPITOLUL 8

Modelarea matematică a proceselor enzimaticice

Importanța majoră a enzimelor în procesele celulare implică cunoașterea de către bioinginerul medical și biofizician a principiilor fundamentale ale reacțiilor enzimaticice și mai ales a aspectelor cantitative, atât de utile în *aplicațiile biotehnologice*. Reprezentarea schematică a celei mai simple reacții enzimaticice este de forma:



unde: prin **E** și **S** se notează enzima și substratul, iar prin **ES** și **P** se notează complexul enzimă - substrat și produsul de reacție. Constantele de viteză pentru prima și cea de-a doua fază a reacției se notează cu **k**, primind semnul plus pentru sensul direct al reacției și semnul minus pentru sensul invers.

De regulă, constanta de viteză a reconversiei produsului final în complex enzimă - substrat este foarte mică, practic

neglijabilă. Considerându-se neglijabili gradientii de concentrație din reactor (concentrație constantă în toate zonele bioreactorului) și notându-se valorile inițiale cu S_0 , E_0 , $(ES)_0=0$ și $P_0=0$ se pot scrie ecuațiile diferențiale care oferă imaginea cantitativă a transformărilor suferite de enzimă și substrat. Forma generală a ecuațiilor este:

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i(x_1, \dots, x_n) \quad (3)$$

ceea ce conduce la sistemul de mai jos.

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -k_{+1}SE + k_{-1}[ES] + \gamma \\ \frac{dE}{dt} &= -k_{+1}SE + k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} &= k_{+1}SE - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] \\ \frac{dP}{dt} &= k_{+2}[ES] \end{aligned} \quad (4)$$

Constantele de viteză k asigură și omogenizarea dimensională.

Dacă prin S se desemnează cantitatea de substrat din reactor, cu v se notează fluxul de substrat care intră în reactor și care, are aceleași dimensiuni ca și $\frac{dS}{dt}$ și se exprimă în moli/litru - secundă în condițiile în care S , E și ES se exprimă în moli/litru.

Se observă că prin sumarea celei de-a doua și celei de-a treia din ecuațiile de mai sus se obține condiția de conservare a cantității de enzimă din reactor, adică atât cantitatea de enzimă cuplată cu substratul cât și cantitatea de enzimă liberă:

$$\frac{d(E + [ES])}{dt} = 0 \Leftrightarrow E + [ES] = \text{const.} = E_0 \quad (5)$$

Rezultă că se poate înlocui $E + [ES]$ și cu E_0 precum și E cu E_0 .

Din sistemul de mai sus rezultă:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -k_{+1}S(E_0 - [ES]) + k_{-1}[ES] + \gamma \\ \frac{d[ES]}{dt} &= k_{+1}SE_0 - [ES](k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}S) \end{aligned} \quad (6)$$

Sistemul se poate adimensionaliza prin intermediul valorilor de referință ale concentrației de substrat și respectiv de complex enzimă-substrat, alese ca fiind valorile de echilibru adică cele pentru care valorile vitezelor de variație respective se anulează.

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} = 0 &\Rightarrow \bar{S} = \text{const.} \\ \frac{d[ES]}{dt} = 0 &\Rightarrow [\bar{ES}] = \text{const.} \end{aligned} \quad (7)$$

Sistemul de ecuații diferențiale de la care am pornit conduce astfel la:

$$\begin{aligned} -k_{+1}\bar{S}[E_0 - [\bar{ES}]] + k_{-1}[\bar{ES}] + \gamma &= 0 \\ k_{+1}\bar{S}E_0 - [\bar{ES}](k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}\bar{S}) &= 0 \end{aligned} \quad (8)$$

De aici se pot determina valorile de echilibru ale concentrațiilor de complex enzimă-substrat și respectiv substrat.

Din prima ecuație rezultă valoarea de echilibru pentru concentrația de complex enzimă-substrat:

$$[\bar{ES}] = \frac{k_{+1}\bar{S}E_0}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}\bar{S}} \quad (9)$$

Apoi se obține concentrația de echilibru a substratului:

$$\frac{k_{+1}\bar{S}E_0 - \gamma}{k_{+1}\bar{S} + k_{-1}} = \frac{k_{+1}\bar{S}E_0}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}\bar{S}} \Leftrightarrow \bar{S} = \frac{\gamma(k_{-1} - k_{+2})}{k_{+1}[k_{+2}E_0 - \gamma]} \quad (10)$$

Se introduce k_m :

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (11)$$

Astfel că se poate scrie:

$$\begin{aligned} \bar{S} &= \frac{\gamma k_m}{k_{+2} E_0 - \gamma} \\ \bar{ES} &= \frac{k_{+1} E_0 \bar{S}}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1} \bar{S}} \end{aligned} \quad (12)$$

Înlocuind prima relație în cea de-a doua rezultă și expresia de echilibru a lui [ES] :

$$\begin{aligned} \bar{ES} &= \frac{\gamma}{k_{+2}} \\ \bar{S} &= \frac{\gamma k_m}{k_{+2} E_0 - \gamma} \end{aligned} \quad (13)$$

Pentru $\bar{S} > 0 \Rightarrow k_{+2} E_0 > \gamma$

Noile variabile adimensionale se definesc astfel:

$$\begin{aligned}x_1 &= \frac{ES}{\overline{E} \overline{S}} \\x_2 &= \frac{S}{\overline{S}}\end{aligned}\quad (14)$$

În apropierea stării stabile aceste variabile adimensionale tind către valoarea unitară, iar noul sistem se poate scrie sub următoarea formă, care scoate în evidență noile variabile:

$$\frac{dx_2}{dt} = -k_{+1}x_2E_0 + k_{+1}x_2 \frac{ES}{\overline{E} \overline{S}} + \frac{k_{-1}}{\overline{S}} \frac{ES}{\overline{E} \overline{S}} \overline{E} \overline{S} + \frac{\gamma}{\overline{S}} \quad (15)$$

$$\frac{dx_1}{dt} = k_{+1} \frac{E_0}{\overline{E} \overline{S}} \frac{S}{\overline{S}} \overline{S} - x_1 \left(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1} \frac{S}{\overline{S}} \overline{S} \right) \quad (16)$$

adică:

$$\begin{aligned}\frac{dx_1}{dt} &= k_{+1}E_0x_2 \frac{\overline{S}}{\overline{E} \overline{S}} - x_1 (k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}x_2 \overline{S}) \\ \frac{dx_2}{dt} &= -k_{+1}x_2E_0 + k_{+1}x_2x_1 \overline{E} \overline{S} + k_{-1}x_1 \frac{\overline{E} \overline{S}}{\overline{S}} + \frac{\gamma}{\overline{S}}\end{aligned}\quad (17)$$

și deci:

$$\frac{dx_1}{dt} = k_{+1} \overline{S} \left[\frac{E_0x_2}{\overline{E} \overline{S}} - \frac{x_1}{\overline{S}k_{+1}} (k_{-1} + k_{+2} + x_2 \overline{S}k_{+1}) \right] \quad (18)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_{+1} \overline{E} \overline{S} \left[-\frac{E_0 x_2}{\overline{E} \overline{S}} + x_1 x_2 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \frac{x_1}{\overline{S}} + \frac{\gamma}{\overline{E} S k_{+1}} \right] \quad (19)$$

Pentru generalizare se introduc notațiile:

$$\begin{aligned} \frac{E_0}{\overline{E} \overline{S}} &= a = \frac{E_0}{\gamma} k_{+2} \\ T_1 &= \frac{1}{k_{+1} \overline{S}}, T_2 = \frac{1}{k_{+1} \overline{E} \overline{S}} \end{aligned} \quad (20)$$

Prima ecuație din sistem se transformă astfel ca să se pună în evidență atât noile variabile cât și parametrul k_m :

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{1}{T_1} \left[ax_2 - \frac{x_1}{k_{+1} \overline{S}} (k_{-1} + k_{+2}) - x_1 x_2 \right] = \frac{1}{T_1} \left[ax_2 - x_1 \left(\frac{k_m}{\overline{S}} + x_2 \right) \right] \quad (21)$$

Înlocuind expresia lui \overline{S} și folosind notațiile introduse mai sus avem:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{1}{T_1} \left[ax_2 - x_1 \left(\frac{a\gamma - \gamma}{\gamma} \right) + x_2 \right] = \frac{1}{T_1} [ax_2 - x_1 (a - 1 + x_2)] \quad (22)$$

Din ecuația a doua, procedând în mod analog, se obține:

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{1}{T_2} \left[-ax_2 + x_1x_2 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \frac{x_1}{S} + \frac{\gamma}{E S k_{+1} S} \right] \quad (23)$$

Introducând notația:

$$b = \frac{k_{-1}(a-1)}{k_{-1} + k_{+2}} \quad (24)$$

se ajunge la forma:

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{1}{T_2} [-x_2(a-x_1) + bx_1 + a - b + 1] \quad (25)$$

Se introduce raportul ε și variabila adimensională t' :

$$\varepsilon = \frac{T_1}{T_2} \quad (26)$$

$$t' = \frac{t}{T_2} \quad (27)$$

astfel că sistemul de două ecuații diferențiale ia forma:

$$\begin{aligned}\varepsilon \frac{dx_1}{dt'} &= ax_2 - x_1(a - 1 + x_2) \\ \frac{dx_2}{dt'} &= -x_2(a - x_1) + bx_1 + a - b - 1\end{aligned}\quad (28)$$

În practică raportul ε este foarte mic, de ordinul lui 10^{-4} . Din prima ecuație se deduce:

$$ax_2 - x_1(a - 1 + x_2) = 0 \quad (29)$$

$$x_1 = \frac{ax_2}{a - 1 + x_2} \quad (30)$$

adică:

$$\frac{[ES]}{\overline{ES}} = \frac{a \frac{S}{\overline{S}}}{a - 1 + \frac{S}{\overline{S}}} = \frac{as}{(a-1)\overline{S} + S} \Leftrightarrow [ES] = \frac{aS\overline{ES}}{(a-1)\overline{S} + S} = \frac{E_0 S}{S + k_M} \quad (31)$$

unde s-a introdus notația k_M - constanta lui Michaelis:

$$k_M = \left(\frac{E_0}{E S} - 1 \right) S \quad (32)$$

De unde rezultă și formula Michaelis - Menten:

$$[ES] = \frac{E_0 S}{S + k_M} \quad (33)$$

Reprezentarea grafică sugerată de figura de mai jos (Figura 27):

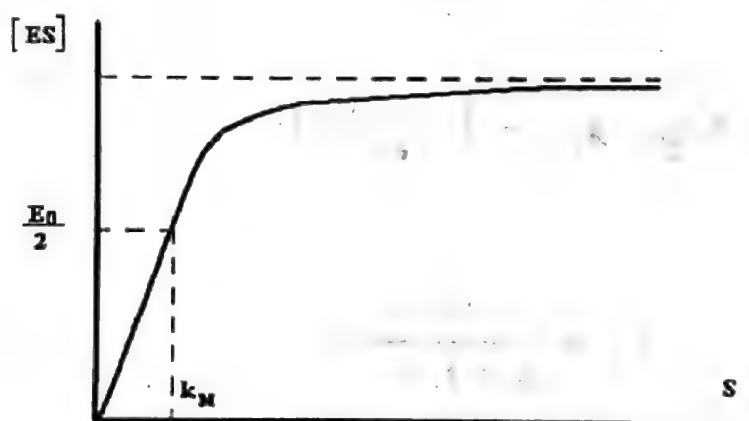


Figura 27. - Reprezentarea grafică a relației cantitative ce descrie procesul enzimatic

Se observă că pentru o valoare a concentrației de complex enzimă - substrat egală cu jumătate din valoarea inițială a concentrației de enzimă:

$$[ES] = \frac{E_0}{2} \quad (34)$$

unde: avem egalitate între constanta lui Michaelis și concentrația de substrat la echilibru:

$$k_M = \overline{S} \quad (35)$$

ceea ce dă și semnificația constantei Michaelis.

Această constantă se dovedește a fi inversul constantei de echilibru a primei faze a procesului, cea de formare a complexului enzimă - substrat, dacă se admite că avem inegalitatea:

$$k_{+2} \ll k_{-1} \quad (36)$$

deci:

$$k_M = \frac{1}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (37)$$

Pentru determinări experimentale este foarte utilă forma inversă a relației Michaelis - Menten:

$$\frac{1}{[ES]} = \frac{1}{E_0} + \frac{k_M}{E_0} \cdot \frac{1}{S} \quad (38)$$

Într-adevăr, trasând dreapta cea mai probabilă printre punctele date perechile de valori S și $[ES]$, se poate determina E_0 din tăietura la ordonată și k_M din panta dreptei; o estimare mai riguroasă este oferită de aplicarea metodei celor mai mici pătrate (Figura 28).

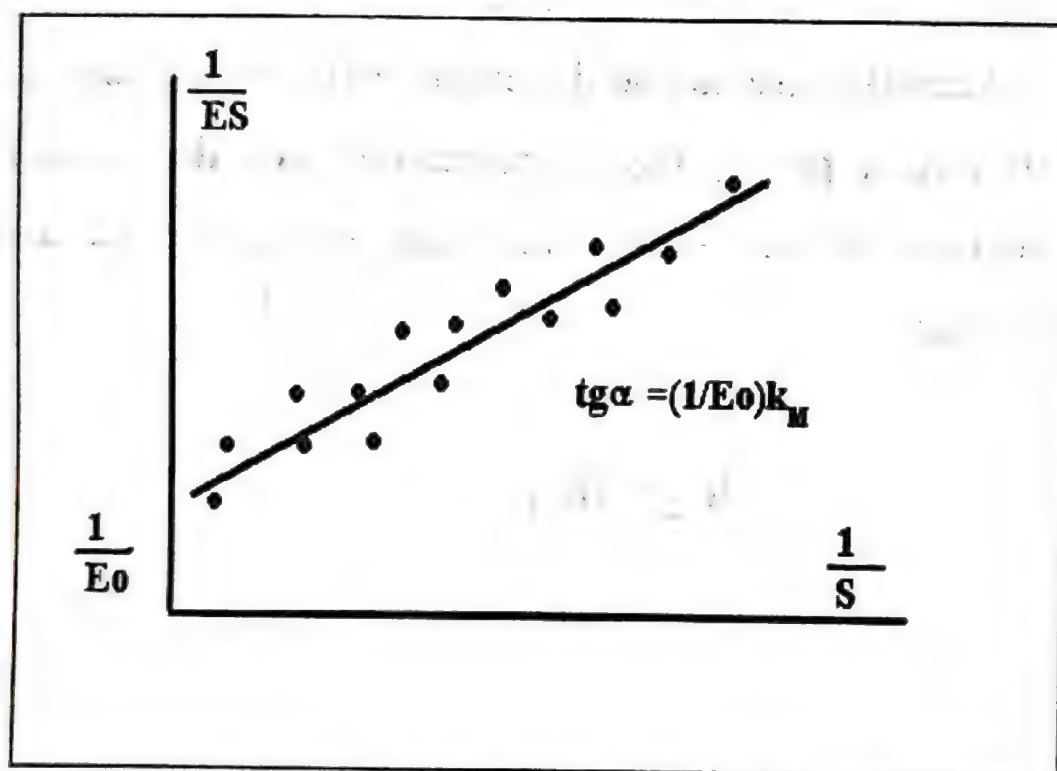


Figura 28. - Reprezentarea grafică a relației Michaelis - Menten în formă liniară

În celulele organismului uman, obiectul de studiu esențial al științelor medicale, ca și în celulele

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

microorganismelor - materialul biologic principal în multe biotehnologii furnizoare de medicamente sau alimente, procesele enzimatică sunt adesea mult mai complexe și necesită abordări matematice și experimentale multiple.

CAPITOLUL 9

Acizii nucleici și interacțiunile intermoleculare

Acizii nucleici (localizați în nucleul celular) - acidul dezoxiribonucleic – ADN și acidul ribonucleic - ARN - sunt biopolimeri direct implicați în procesele de transmitere a informației genetice caracteristice fiecărei specii.

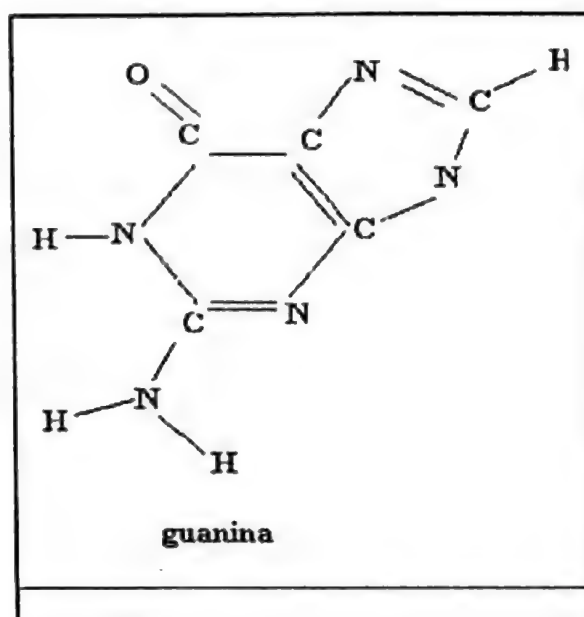
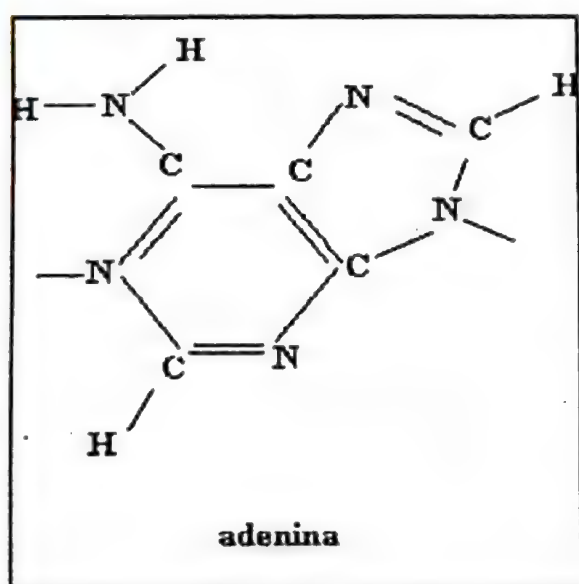


Figura 29. - Bazele purinice din compoziția acidului nucleic ADN

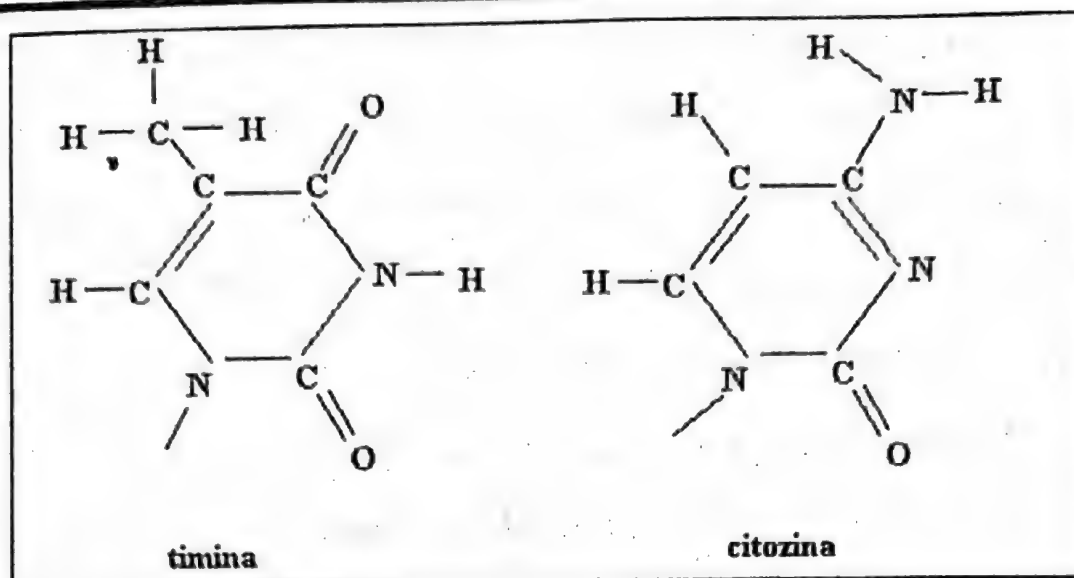


Figura 30. Bazele pirimidinice din compoziția acidului nucleic ADN

Din punct de vedere chimic, acizii nucleici sunt molecule polimere constituite din trei componente: acid fosforic, un zaharid (dezoxiriboză – în structura ADN, respectiv riboză – în ARN) și baze azotate purinice (adenină și guanină - Figura 29) și pirimidinice (citozină și timină, respectiv uracil - Figura 30).

Elementele structurale de bază (monomerii) ale moleculelor înalt polimerizate de acizi nucleici sunt *nucleotidele*. Hotărâtoare pentru specificitatea genetică este ordinea bazelor în lanțul polinucleotidic.

Acidul ribonucleic (ARN) are funcția de a depozita informația genetică. Acesta se caracterizează printr-un singur lanț de nucleotide și are dimensiuni mai mici în comparație cu

molecula de ADN. În structura moleculelor de ARN intră tot patru baze azotate, însă în locul timinei din ADN apare o altă bază numită uracil. Ca purtător al informației ereditare, o importanță mult mai mare la scara organismelor vii revine *acidului dezoxiribonucleic (ADN)*.

La majoritatea organismelor, molecula de ADN este alcătuită din două lanțuri elicoidale de polinucleotide - ceea ce reprezintă structura primară (Figura 31 și 32).

Aceste lanțuri sunt dispuse antiparalele și legate unul de altul, la nivelul bazelor azotate, prin *punți de hidrogen* și *legături disulfurice* fiind răsucite în spirală - ceea ce reprezintă structura lor secundară.

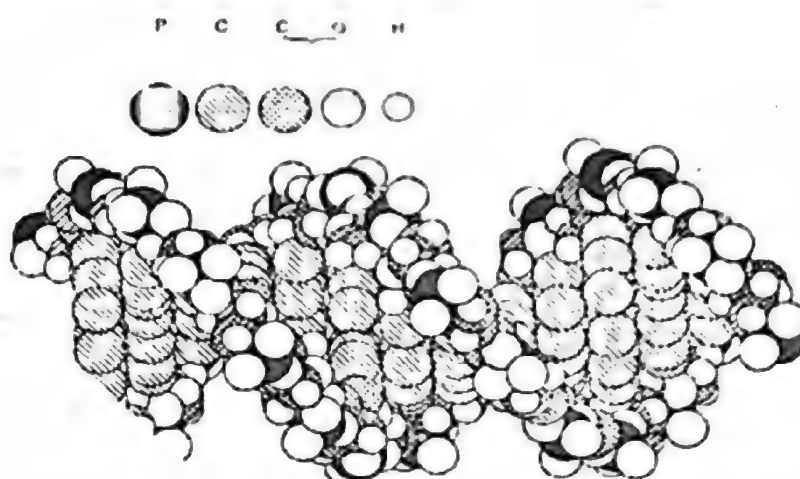
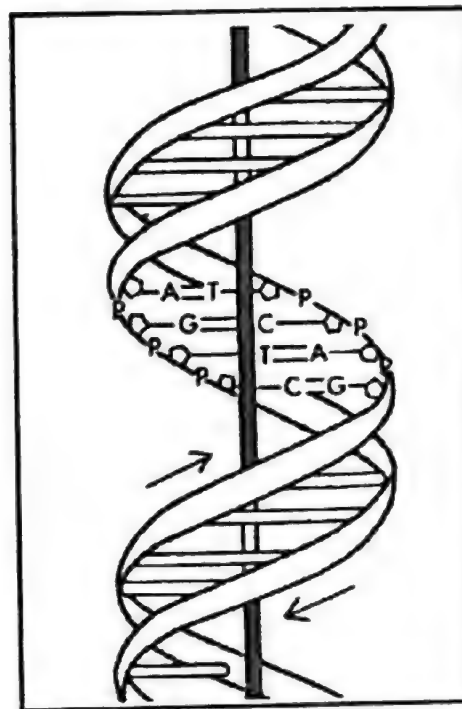


Figura 31. - Detaliu structural din molecula de acid dezoxiribonucleic. Sunt figurați distinct atomii de fosfor, carbon, oxigen și hidrogen (J. Darnell și col. 1990)

Legăturile de hidrogen se realizează numai între o bază purinică și una pirimidinică, adică exclusiv între o citozină și guanină, respectiv, între adenină și timină.

Împerecherea bazelor complementare prezintă importanță nu numai pentru structura intrinsecă a ADN, ci și în procesele ereditare, prin faptul că favorizează replicarea identică și transmiterea informației. Ca și la ARN, secvența bazelor reprezintă factorul determinant al specificității genetice a ADN.

Figura 32. - Segment dintr-o moleculă ADN în care bazele complementare de pe cele două lanțuri vecine sunt (A - adenina și T - timina sau C - citozina și G - guanina) unite prin legături de hidrogen care pot fi rupte în urma energizărilor cauzate de absorbția unor radiații. Pe o spirală de ADN există de regulă 10 perechi de baze (J. Darnell și col. 1990)



Ca și bazele azotate din constituția lor și la fel cu majoritatea covârșitoare a proteinelor, acizii nucleici absorb în domeniul ultraviolet al radiației solare.

Expunerea la radiațiile ultraviolete poate produce reorganizarea legăturilor de hidrogen la fel ca și expunerea la

radiațiile ionizante (efectele genetice ale radiațiilor ultraviolete sunt comparabile cu cele ale radiațiilor ionizante).

Radiobiologia și genetica oferă mijloacele adecvate de investigare a transformărilor de care sunt susceptibile aceste biomolecule complexe din nucleul celular al eucariotelor sau din plasmidele procariotelor.

CAPITOLUL 10

Elemente de biofizica membranelor celulare

10.1. Structura membranei celulare

Din punct de vedere biochimic principalii constituenți membranari sunt proteinele, lipidele și colesterolul. Cele mai importante funcții ale *proteinelor* sunt cele de permeabilizare și cele enzimatică. Astfel, unele agregate proteice din membrane au rol în transportul ionilor și moleculelor mici - este vorba de proteinele canal, canalele ionice și pompele ionice care sunt alcătuite din subunități proteice intrinseci, capabile să străbată membrana de la o față la cealaltă. Alte agregate proteice au rol de receptori membranari pentru diferite tipuri de molecule mesager (hormoni sau neurotransmițători care nu pot traversa membrana). Acestea se găsesc cel mai adesea la fața externă a membranei - sunt proteine extrinseci.

Pompele ionice au și funcție enzimatică controlând reacțiile biochimice exergonice din care se eliberează energia necesară funcțiilor de transport activ pe care le îndeplinesc. Alte proteine enzimatică sunt cele de pe fața internă a

membranei care au rol efector în raport cu informația receptată de la moleculele mesager captate la fața externă a membranei.

Din punct de vedere electric, proteinele sunt adesea dipoli electrici semnificativi, cu atât mai mult cu cât au molecula mai alungită și de dimensiuni mai mari. Proteinele care includ în constituția lor resturi de molecule glucidice sau lipidice sunt cunoscute sub denumirea de *glicoproteine* și *lipoproteine*.

Reamintim că *lipidele* sunt macromolecule formate dintr-un "*cap polar*" și două lanțuri de acizi grași, saturați sau nesaturați, care nu sunt polare, nu au caracterul dipolilor electrici. În constituția biomembranelor, lipidele apar cel mai frecvent sub forma unui dublu strat lipidic, dar pot fi prezente și sub forma unor micle sau agregate lipoproteice. Bistratul lipidic este cel mai răspândit, făcând parte din constituția unui tip de membrană de larg consens reprezentat prin *modelul mozaicului fluid* (propus de Singer și Nicholson - Figura 33). Capetele polare ale lipidelor din bistrat sunt orientate spre mediile apoase, polare din exteriorul și respectiv interiorul celulei, în timp ce lanțurile nepolare sunt orientate unul spre celălalt, interacționând prin legăturile hidrofobe care sunt principalele tipuri de interacțiuni ce asigură stabilitatea acestor structuri.

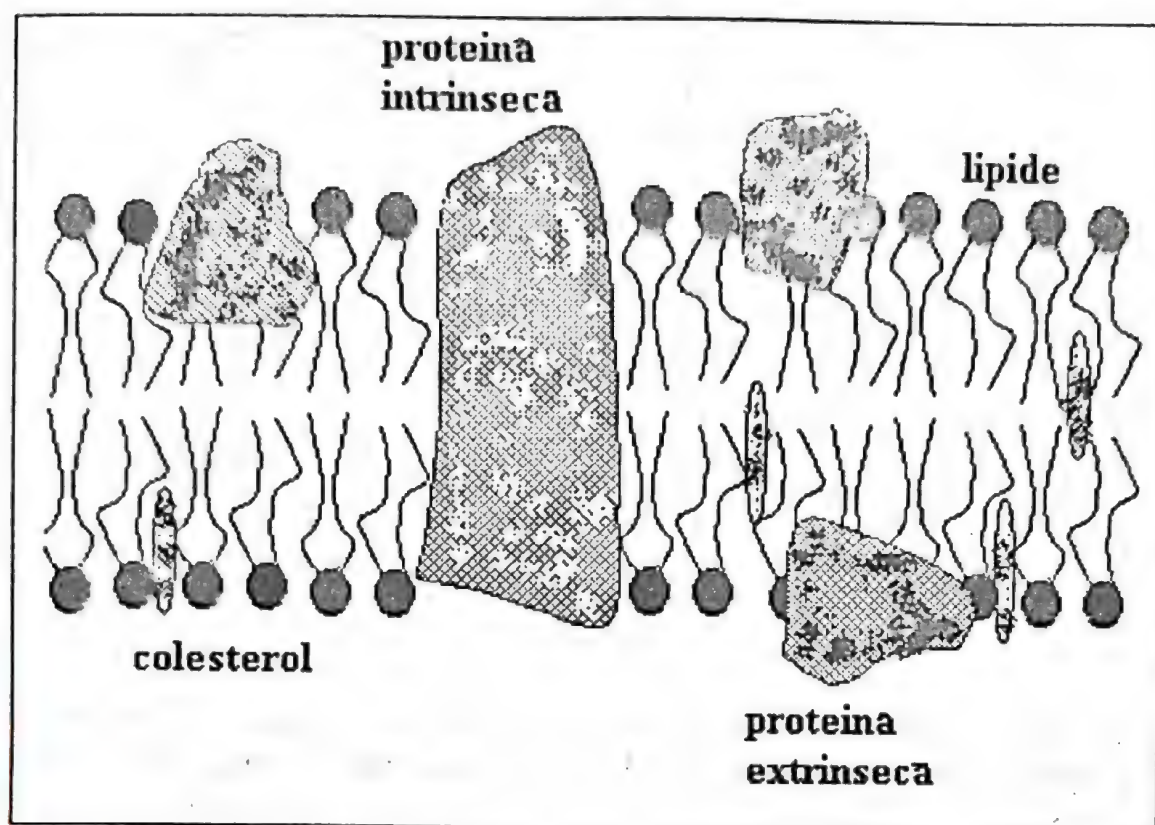


Figura 33. - Model structural al membranelor reprezentabile prin "mozaicul fluid" (după J. Darnell)

În modelul *mozaicului fluid* proteinele sunt în proporție de circa 50% din masa totală a membranei și sunt inserate în dublul strat lipidic, fie sub formă de proteine intrinseci - care străbat membrana de la o față la cealaltă, fie sub formă de proteine extrinseci, care sunt inserate în bistratul lipidic numai la nivelul feței externe sau numai la nivelul feței interne ale membranei.

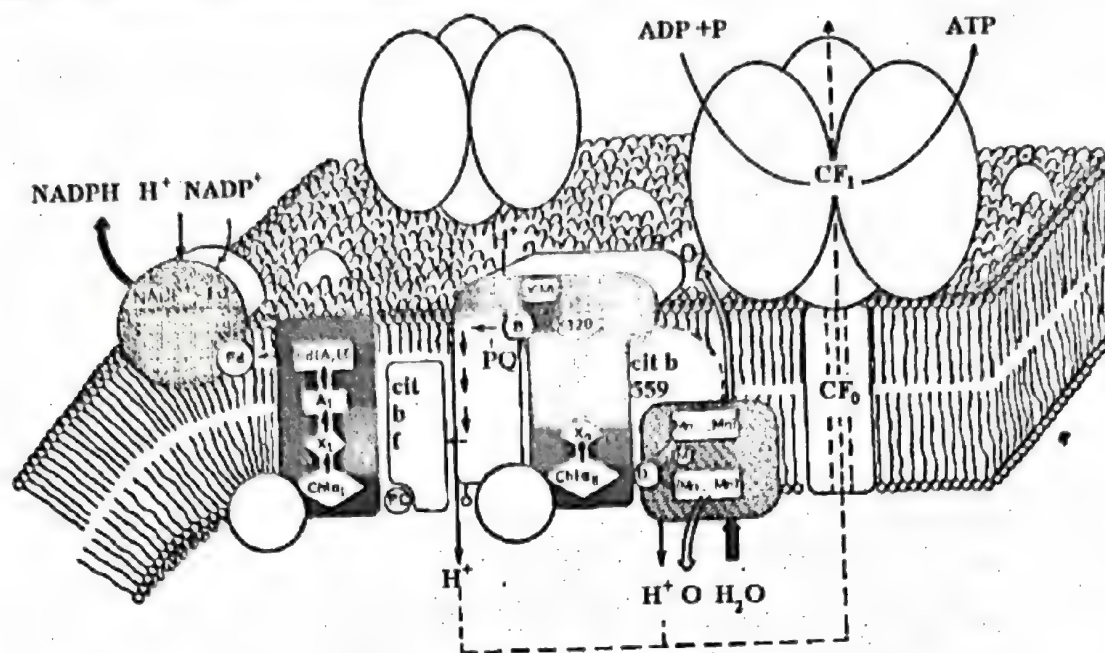


Figura 34. - Membrana cloroplastelor este bogată în proteine enzimatice fiind reprezentată prin modele de subunităților structurale (după W. Hope și col. 1983).

În cazul altor tipuri de membrane, mai puțin răspândite în rândul celulelor eucariote, proteinele sunt prezente în proporție de peste 70% în membrană și sunt structurate conform unor modele bazate pe subunitățile lipoproteice - *modele bazate pe subunități lipoproteice* sau pe *micele de lipide*, bistratul lipidic ne mai fiind singura formă de organizare a lipidelor (Figurile 34 și 35). Spre deosebire de proteinele care au rol în permeabilizarea membranei, principala funcție a lipidelor este cea de barieră de permeabilitate pentru majoritatea tipurilor de ioni și molecule implicate în funcțiile metabolice celulare (cu excepția unor molecule liposolubile care pot străbate membrana

- de exemplu hormoni steroizi). În tabelele de mai jos (Tabelele 7 și 8) sunt redate conținuturile în proteine și lipide precum și câteva valori ale unor parametri fizici ai membranelor naturale și ai membranelor artificiale bilipidice, așa cum au fost sintetizați de V. Vasilescu și col. (1977):

Tabelul 7. - Parametrii fizici ai unor biomembrane (după V. Vasilescu și col. 1977)

Parametrul	Membrane naturale	Membrane artificiale bilipidice
Grosime (Å)	40-130	60-90
Rezistență electrică (Ω/cm)	10^2 - 10^5	10^3 - 10^9
Capacitate electrică ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	0,5-1,3	0,3-1,3
Potențial electric de repaus (mV)	10-88	0-140
Indice de refracție	1,55	1,37
Tensiune superficială (erg/cm^2)	0,03-3,0	0,2-2,4
Permeabilitate pentru apă (10^{-4} cm/s)	25-28	2,3-24

Tabelul 8. Conținutul de lipide și proteine al unor biomembrane (după V. Vasilescu și col. 1975)

Membrana	Proteine (%)	Lipide (%)
Eritrocit	60-80	20-40
Cloroplast	45	<55
Membrana externă a mitocondriei	55	<45
Teaca de mielină a axonului neuronal	20	<80
Bastonaș retinian	40-60	20-40

Structurile membranare cu cel mai mare conținut de proteine sunt întâlnite pe de o parte la membranele microorganismelor și pe de alta parte la celulele eucariote în membrana internă a mitocondriei (cu rol esențial în fosforilarea oxidativă).

Colesterolul este o moleculă mai mică, din clasa steroizilor, prezentă în doar câteva procente în constituția membranelor, dar având un rol bine determinat în controlarea fluidității și, complementar, a rigidității membranei. Prezența colesterolului este deosebit de importantă pentru relativa stabilitate a formei membranei și implicit a formei ansamblului perete celular - membrană - citoschelet.

10.2. Proteine canal și canale ionice

Transportul moleculelor mici și al ionilor prin biomembrane este efectuat la nivelul proteinelor canal și al canalelor ionice.

Proteinele canal traversează membranele și formează pori membranari - canale de dimensiuni transversale relativ mari și relativ neselectivi - mai ales la nivelul membranelor bacteriilor, mitocondriilor și cloroplastelor.

În membranele plasmatice ale celulelor animale și vegetale sunt prezenți "pori" de mare selectivitate și de dimensiuni relativ mici - *canalele ionice*. Trecerea ionilor prin canalele ionice se efectuează numai în sensul gradientului electrochimic, deoarece aceste complexe proteice nu sunt cuplate la nici o sursă de energie (transport pasiv).

Spre deosebire de proteinele canal, canalele ionice nu sunt deschise tot timpul, ci deschiderea lor este activată în anumite condiții. Principalele tipuri de perturbații de la nivelul membranelor celulare care sunt capabile să declanșeze activarea canalelor ionice sunt variațiile de potențial electric, stimularea mecanică și legarea unei molecule semnal.

Există, așadar, canale ionice dependente de voltaj, canale ionice controlate mecanic și canale ionice controlate de ligand.

Acestea din urmă pot fi controlate de o moleculă semnal din exteriorul celulei - un neurotransmițător, de un ligand din interiorul celulei - un mediator intracelular, de o nucleotidă (cAMP sau cGMP) sau de o proteină reglatoare de tip G.

Importante date privind dinamica funcțională și electrogenetică a canalelor ionice au fost furnizate datorită cercetărilor moderne privind microelectrofiziologia membranei celulare prin tehnica de "patch clamp".

De altfel, celulele excitabile animale, sunt reprezentative pentru varietatea de canale ionice identificate acestea fiind semnalate și în regnul vegetal (cu rol de exemplu în mobilitatea stimulată a frunzelor mimozei), sau în lumea microorganismelor (cu rol în locomoție la *Paramecium* sp.).

10.2.1. Tipuri de canale ionice

Actualmente se cunosc peste cincizeci de tipuri de canale ionice, dintre care menționăm doar câteva tipuri:

- *canale rapide de sodiu;*
- *canale lente de sodiu și calciu;*
- *canale de calciu voltaj dependente;*
- *canale lente pentru potasiu, voltaj dependente;*
- *canale lente pentru potasiu – calciu dependente;*

- canale de clor voltaj dependente;
- canale cationice de acetilcolină;

Canalele de potasiu (Figura 35) sunt direct implicate în electrogeneza potențialului de membrană și de acțiune controlând, trecerea liberă a ionilor de potasiu prin membrană. Deoarece concentrația potasiului în interior este mai mare decât în exterior, are loc o difuzie masivă a potasiului sub acțiunea gradientului de concentrație de la interior spre exteriorul celulei.

În prezența efectului Donnan, prin această deplasare, are loc un dezechilibru la nivelul sarcinilor electrice negative ale ionilor macromoleculari, nedifuzibili, existenți în interiorul celulei.

Ionii de sodiu contribuie parțial la echilibrul electric al interiorului celulei, dar concentrația lor în mediul intracelular este menținută la nivel scăzut printr-un transport activ generat sub acțiunea pompei de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.

Pentru menținerea echilibrului electric și respectiv al potențialului membranal, al celulei neexcitate (în absența oricăror stimuli externi), o parte din ionii de potasiu din mediul extracelular sunt atrași înapoi prin aceleași canale de potasiu - de forțele electrice care apar datorită efectului Donnan.

Canalele ionice voltaj dependente - joacă un rol esențial în generarea potențialelor de acțiune ale celulelor excitabile, în prezența unor stimuli specifici ca depolarizanți membranari.

Depolarizarea membranară atrage după sine prin micșorarea potențialului membranar, deschiderea unor canale de sodiu sensibile la voltaj (Figura 36).

Pe durata de timp cât rămân deschise, o mică cantitate de sodiu intră în celulă datorită unui gradient de concentrație membranar, accentuând depolarizarea, până când variația gradientului electric, contracarează gradientul de concentrație.

Aceste canale sunt prevăzute cu un mecanism automat de inactivare, determinând blocarea influxului de sodiu pentru o scurtă perioadă și reechilibrarea potențialului electric.

Activarea acestor canale, în maniera "totul sau nimic" a fost semnalată prin dezvoltării tehnicilor de investigație de tip *patch-clamp*. Aceasta permite ca o mică porțiune din membrană, reductibilă până la o zonă corespunzătoare unui sau câtorva canale ionice să fie "captată" de deschiderea unei micropipete aplicată pe membrană.

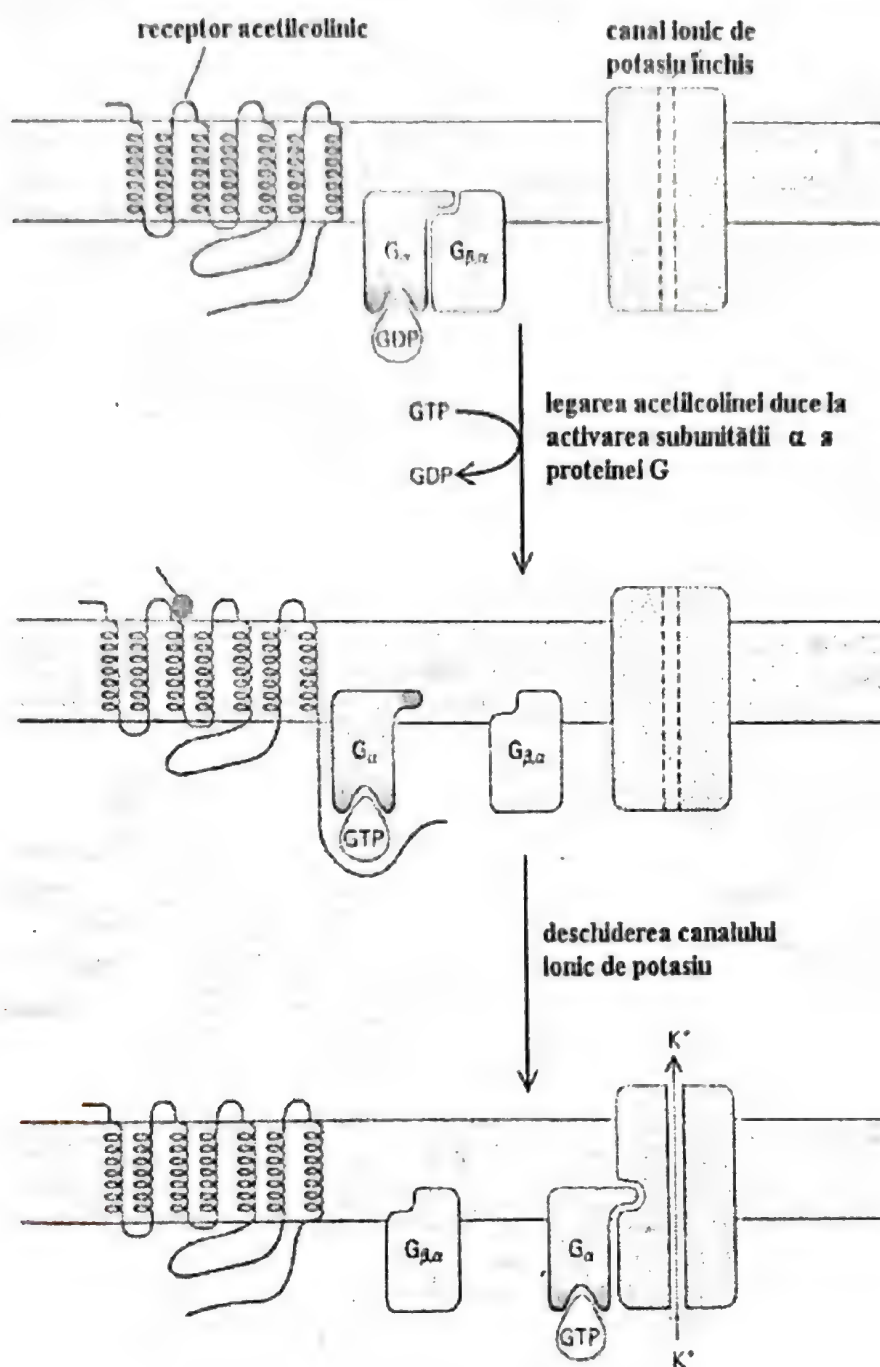


Figura 35. - Deschiderea unui canal de potasiu sub controlul acetilcolinei. Subunitatea G_{α} inactivă - purtătoare a GDP-ului este activată de acetilcolină și leagă GTP-ul. Subunitatea $G_{\alpha\beta}$ preluând GTP-ul comandă deschiderea canalului (J. Darnell și col. 1990).

S-a constatat că numărul canalelor de sodiu deschise variază în funcție de gradul de depolarizare membranară, iar gradul de deschidere al unui canal nu prevede faze tranzitorii.

În celulele musculare, pe un micron pătrat de sarcolemă au fost deja identificate câteva sute de canale, ceea ce înseamnă că un canal revine la circa 10.000 de molecule fosfolipidice.

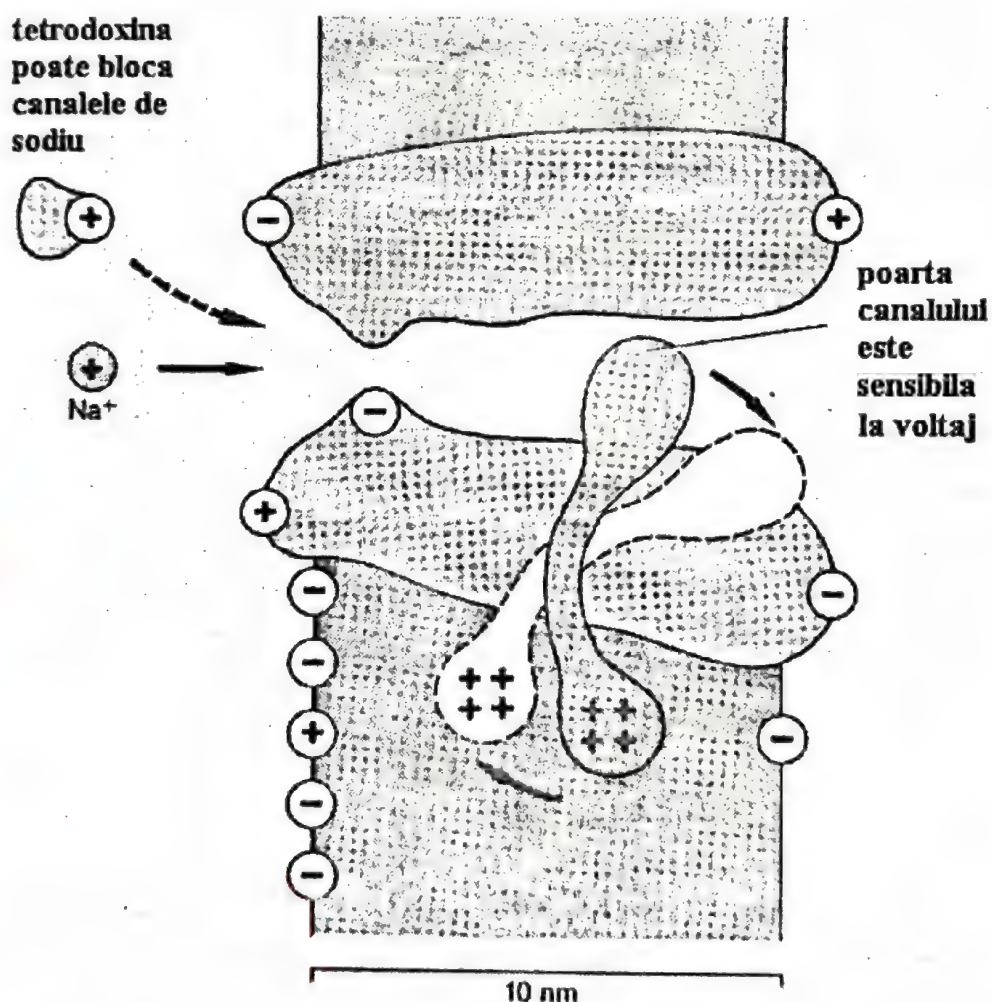


Figura 36. - Canal ionic de sodiu sensibil la voltaj (W. Hope și col. 1983).

Densitatea relativ mică a canalelor este compensată , însă de conductanța relativ mare prin parcurgerea unui canal de 8.000 de ioni pe milisecundă (ms).

Canalele cationice controlate de acetilcolină sunt destinate transducției semnalelor chimice extracelulare, în semnale electrice intracelulare, la nivelul sinapselor chimice dintre celulele nervoase și celulele controlate de acestea, prevăzute cu receptori specifici acestui neurotransmițător.

Receptorii colinergici sunt glicoproteine pentamerice, compuse din câte cinci subunități relativ insensibile la variații de potențial membranar. Asemenea agregate proteice receptoare determină variații de permeabilitate membranară pentru sodiu, potasiu și calciu, care cauzează ulterior variații de potențial electric de membrană.

Contribuția unuia sau altuia dintre cationi la fluxul transmembranar depinde de gradientul de concentrație al fiecăruia și de gradientul electric transmembranar. Influxul semnificativ de sodiu este în general, cel mai remarcabil indiciu al activării acestor canale (circa 30.000 ioni pe milisecundă pot parcurge fiecare canal activat).

Dacă celula inervată este celula musculară striată sau netedă, atunci influxul masiv de sodiu determină o depolarizare electrică care reprezintă și semnalul declanșator al cuplului

excitație contracție (M. Isac și R. M. Isac 1985; F. Topoliceanu și I. Haulică 1989; M. Isac și R. M. Isac 1990; M. Isac și R. M. Isac 1991; M. Isac și R. M. Isac 1994).

Ca și canalele de sodiu voltaj dependente, canalele controlate de acetilcolină, rămân deschise pe o perioadă de timp relativ scurtă, în decursul căreia molecula semnal cuplată la zona receptoare de la fața externă a membranei postsinaptice este degradată (hidrolizată).



Figura 37. - Imagini obținute la microscopul electronic pentru câteva agregate proteice cu funcție de canale ionice de calciu extrase din membrana depozitelor intracelulare de calciu de la nivelul reticulului endoplasmic (J. Darnell și col. 1990)

În Figura 35 este redată funcționarea unui canal ionic de potasiu, activat de acetilcolină, cuplată la un receptor

membrana care deși, nu este parte constituantă a canalului ionic, prin intermediul unei *proteine G*, poate realiza controlul deschiderii acestui canal. În acest caz, se poate spune că cele mai variate tipuri de canale se întâlnesc în cazul ionilor de potasiu.

Unul dintre canalele ionice cel mai mult studiate este cel de calciu (Figurile 37 și 38) de la nivelul rezervelor citoplasmatiche atașate reticulului endoplasmic (cu rol deosebit de important în contracția fibrelor musculare).

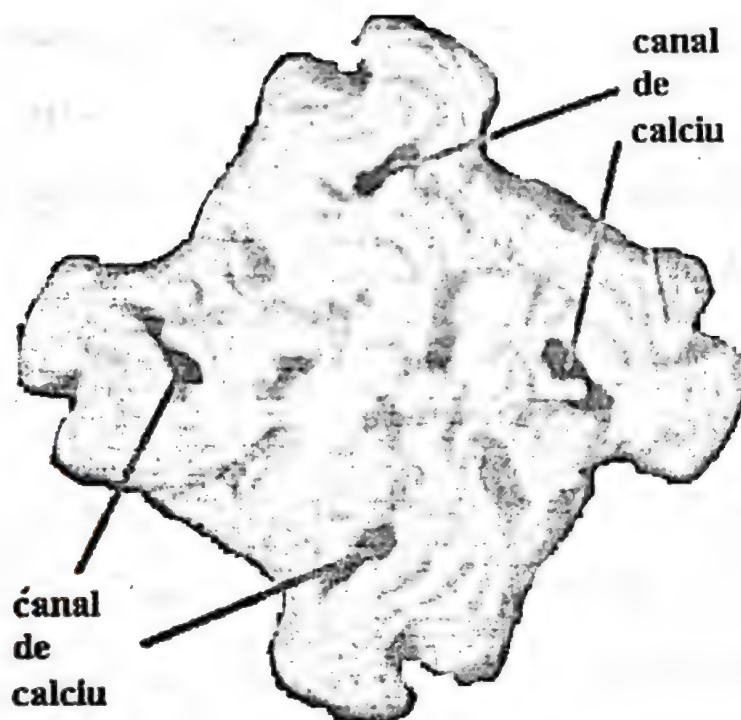


Figura 38. - Agregatul proteic care asigură eliberarea ionilor de calciu din depozitele citoplasmatiche în citoplasmă (J. Darnell și col. 1990)

Imaginea tridimensională (Figura 38), reconstruită din datele microscopiei electronice arată că agregatul proteic

corespunzător este format din patru subunități identice fiecare cu câte un canal pentru ioni de calciu.

10.3. Permeabilitatea și transportul transmembranal

Proprietatea de permeabilitate selectivă a biomembranelor pentru ioni mici (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , Mg^{+2} , etc.) ajută la explicarea a numeroase fenomene de importanță vitală pentru activitatea celulară: transportul la nivelul epiteliilor, bioelectrogenza din celulele nervoase, musculare, vizuale, etc., comunicarea intercelulară prin intermediul neurotransmițătorilor și hormonilor, transducția senzorială, etc.

Odată cu rolul de conturare și delimitare morfologică a structurilor celulare, membrana celulară constituie o veritabilă barieră de control selectiv a schimburilor de substanță, energie și informație, (Figura 39) care sunt modulate prin intervenția unor fenomene de micro – și macrotransfer membranal (F. Topoliceanu și col. 1974; F. Topoliceanu și col. 1991).

Principalele tipuri de transport prin membrane sunt: *macrotransportul* (transport de particule și macromolecule) și *microtransportul* (molecule mici și ioni).

• **Macrotransportul** poate fi efectuat direct sau prin intermediul veziculelor, sub formă de: *endocitoză*, *exocitoză* și *transcitoză*.

În *endocitoză* are loc o intrare în celulă a particulelor de substanță, virusuri și macromolecule, în timp ce în *exocitoză* din contra acestea ies din celulă, iar în *transcitoză* sunt transportate spre celulă particule de substanță și macromolecule pentru ca, iar după o serie de transformări metabolice din celulă sunt transferate, atât macromolecule cât și particule.

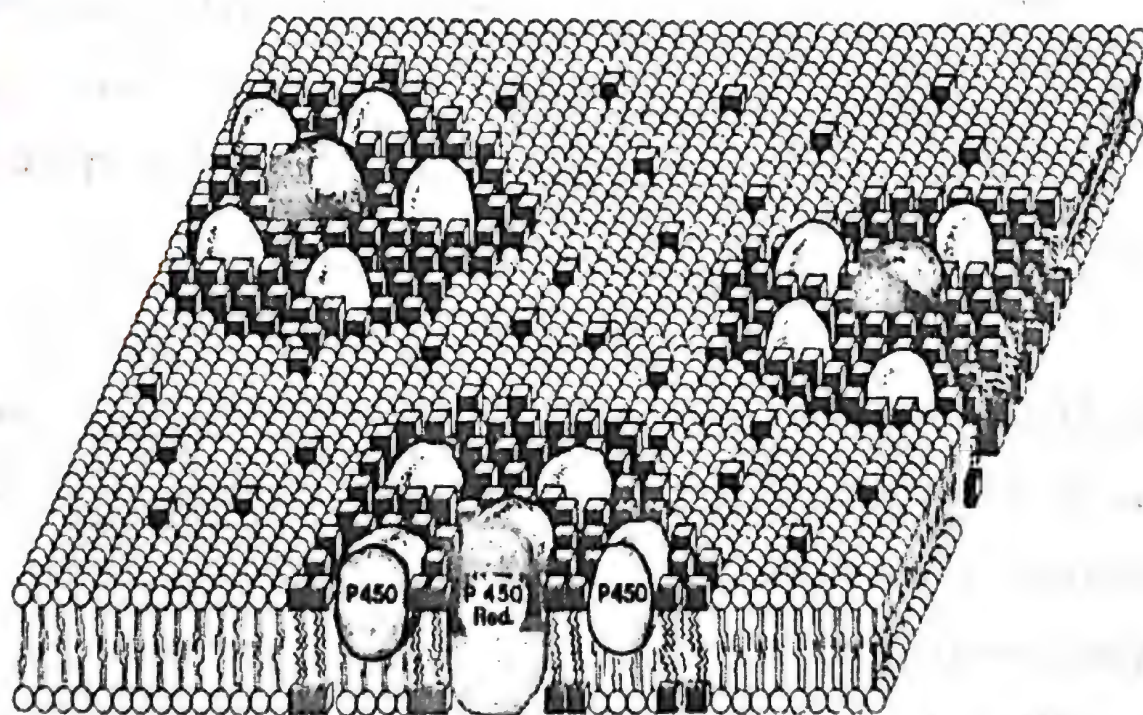


Figura 39. - Model membranar bazat pe domenii de proteine enzimatice încastate în bistratul lipidic rigid. (W. Hope și col. 1983)

• *Microtransportul* în raport cu implicarea unor surse energice sau absența lor, în realizarea transferului de substanță, acesta poate fi:

a.- *transport activ* care este efectuat prin intermediul pompelor ionice și care necesită un cuplaj energetic cu procesele exergonice de la care se preia și se consumă o parte din energia stocată în moleculele de tipul ATP (adenozintrifosfat), NADH (nicotinanidadenindinucleotid), etc.

b.- *transport pasiv* este realizat fără consum de energie metabolică, prin intermediul canalelor ionice.

Transportul activ poate fi realizat la rândul său sub formă de *transport activ primar*, *transport activ secundar* și *translocăție de grup* (transportul unei molecule este însoțit și de o modificare).

Transportul pasiv se desfășoară sub două forme:

a.- *difuzie simplă* prin care în prezența unor gradiente chimice (de concentrație) sau electrochimice (de concentrație și de potențial electric), se realizează circulația unor ioni sau molecule mici, cum sunt cele de apă, uree, glucoză, etc.

b.- *difuzie facilitată* este efectuată prin intermediul unor *proteine transportoare* care cuplează solvitul la una din fețele membranei și, prin modificări conformaționale (în absența unui

consum energetic direct), îl eliberează la cealaltă față membranară.

10.4. Transportul pasiv

10.4.1. Difuzia simplă

Se consideră un ansamblu de două compartimente (Figura 40) care comunică între ele printr-o membrană semipermeabilă (permeabilă pentru specia moleculară considerată) de grosime x , cu suprafața transversală A și cu coeficientul de difuzie D (pentru specia moleculară considerată).

Cantitatea din substanța difuzibilă S aflată la momentul t în cele două compartimente se notează cu $Q_1(t)$ și respectiv $Q_2(t)$ iar concentrațiile corespunzătoare se notează cu $c_1(t)$ și respectiv $c_2(t)$, astfel că:

$$\begin{aligned} c_1(t) &= \frac{Q_1(t)}{V_1}, c_2(t) = \frac{Q_2(t)}{V_2} \\ Q_1(t) + Q_2(t) &= Q = \text{const.} \end{aligned} \quad (39)$$

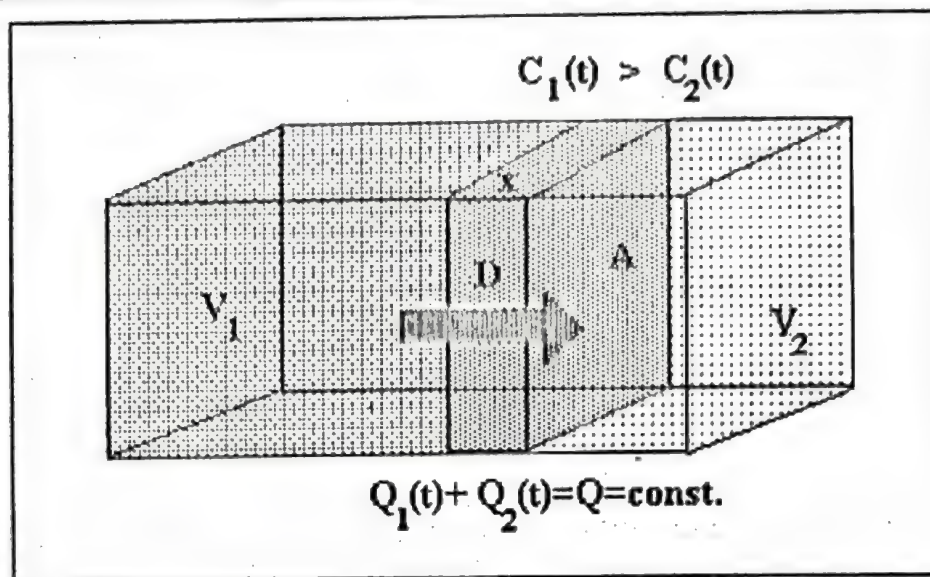


Figura 40. - Sistem bicompartimentat cu membrană de grosime D și secțiune transversală A

Circulația substanței difuzibile între cele două compartimente se realizează în sensul gradientului chimic deci, dacă $c_1(t) > c_2(t)$, atunci membrana va fi străbătută dinspre primul compartiment înspre al doilea.

Conform legilor difuziei:

$$-\frac{dQ_1(t)}{dt} = \frac{AD}{x} (K_{m1}c_1(t) - K_{m2}c_2(t)) \quad (40)$$

unde K_{m1} și K_{m2} sunt coeficienți de partiție (rapoartele de distribuție) ai substanței S între membrană și câte unul din cele două compartimente.

Se notează:

$$K_1 = \frac{K_{m1}}{V_1}, K_2 = \frac{K_{m2}}{V_2} \quad (41)$$

astfel că relația (41) devine:

$$-\frac{dQ(t)}{dt} = \frac{AD}{x} (K_1 Q_1(t) - K_2 Q_2(t)) \quad (42)$$

Această ecuație diferențială de ordinul întâi are ca necunoscută pe $Q_1(t)$, deci:

$$-\frac{dQ_1(t)}{dt} = [KQ_1(t)(K_1 + K_2) - KK'_2] \quad (43)$$

S-au făcut notațiile:

$$K = \frac{AD}{x}, K'_2 = K_2 Q \quad (44)$$

După separarea variabilelor și introducerea noilor constante K_{12} și K''_2 :

$$K_{12} = K(K_1 + K_2), K''_2 = K'_2 K \quad (45)$$

se obține:

$$-\frac{dQ_1(t)}{K_{12}Q_1(t)-K''_2} = dt \quad (46)$$

ceea ce, prin integrare (cu condiția inițială $Q_1(0)=Q_1(t=0)$) conduce la:

$$e^{-K_{12}t} = \frac{K''_2 - K_{12}Q_1(t)}{K''_2 - K_{12}Q_1(0)} \quad (47)$$

De aici se deduce expresia de variație în timp a lui $Q_1(t)$:

$$Q_1(t) = \left[Q_1(0) - \frac{K'_2}{K_1 + K_2} \right] e^{-K_{12}t} + \frac{K'_2}{K_1 + K_2} \quad (48)$$

Prin împărțire cu V_1 se obține expresia de variație în timp a concentrației substanței S în primul compartiment:

$$c_1(t) = \left[c_1(0) - \frac{Q}{V^*} \right] e^{-K_{12}t} + \frac{Q}{V^*} \quad (49)$$

unde s-a notat cu V^* :

$$V^* = \frac{K_{m1} + K_{m2} \frac{V_1}{V_2}}{\frac{K_{m2}}{V_2}} \quad (50)$$

Se observă că:

$$c_1(\infty) = \frac{Q}{V^*} \quad (51)$$

Astfel se obține:

$$c_1(t) - \frac{Q}{V^*} = \left(c_1(0) - \frac{Q}{V^*} \right) \exp \left(- \frac{AD}{x} \left(\frac{K_{m1}}{V_1} + \frac{K_{m2}}{V_2} \right) t \right) \quad (52)$$

ceea ce reprezintă, *scăderea exponențială în timp a concentrației din primul compartiment (sub acțiunea gradientului de concentrație) dependent de grosimea și suprafața transversală a membranei, de cantitatea totală de substanță difuzibilă din cele două compartimente și de valoarea concentrației de echilibru (după un timp suficient de îndelungat) din compartimentul considerat.*

Astfel s-ar desfășura, de exemplu, procesul de difuzie al moleculelor de apă prin "porii apoși" ai biomembranelor în

cadru modelului prezentat. În cazul ionilor trebuie luat în considerare și gradientul electric transmembranar corespunzător.

10.4.2. Difuzia facilitată

Ca și în cazul difuziei simple, difuzia facilitată prin biomembrane a unor substanțe se produce sub acțiunea gradientului electrochimic dispărând odată cu anularea acestuia.

Spre deosebire de difuzia simplă, efectuată prin intermediul canalelor ionice și porilor moleculari, difuzia facilitată, efectuată prin intermediul proteinelor transportoare (*carrier*), poate să se producă cu o viteză mult mai mare decât cea corespunzătoare dimensiunilor sau liposolubilității moleculelor respective, viteză care atinge o valoare de saturație la creșterea gradientului de concentrație și poate fi afectată de prezența unor substanțe cu structuri analoge substanței difuzate.

Din aceste puncte de vedere acest fenomen de microtransport prezintă asemănări cu procesele enzimaticе, a căror viteză atinge o limită de saturație și care sunt, în același timp, procese de competitivitate - competiția dintre două substanțe cu structuri asemănătoare fiind de natură să inhibe participarea la procesul de transport (sau enzimatic) a

substanței urmărite. Deși, la fel ca și relația enzimă - substrat, relația substanță difuzată - proteină transportoare se caracterizează printr-o anumită specificitate.

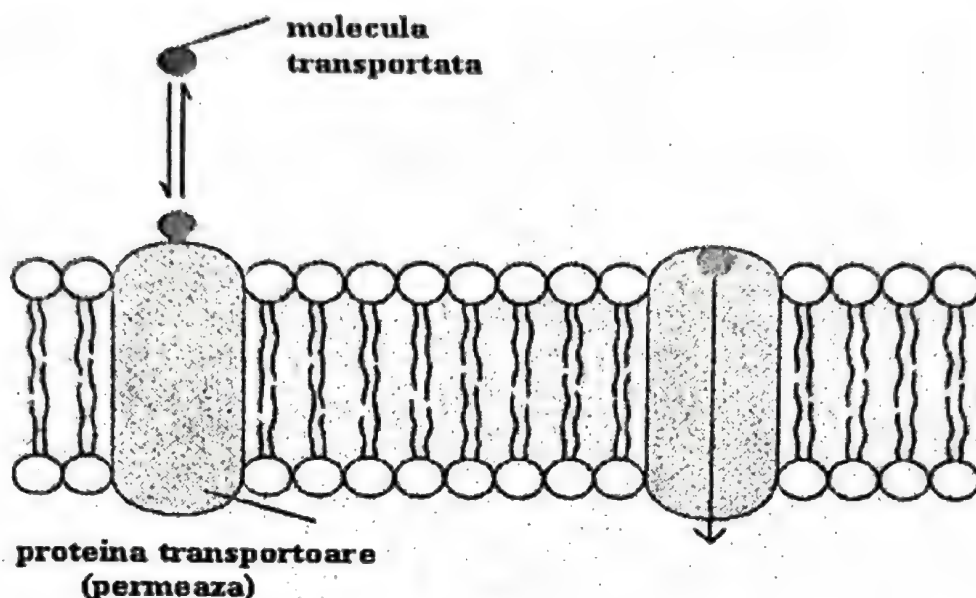


Figura 41. - Proteinele transportoare (permeaze) (după J. Darnell și col. 1990)

Proteina transportoare, deși nu se cuplează în mod direct cu procese biochimice exergonice, este capabilă să efectueze mișcări complexe prin care substanța difuzantă este captată la una din fețele membranei, apoi este transportată (Figura 41) la fața opusă (proteina transportoare fiind de tip intrinsec, adică străbătând membrana de la o față la alta) unde este eliberată.

Unii autori includ în acest tip de microtransport și permeabilitatea de tip ionoforetic (Figura 42) prin care ionoforii

(molecule cu structură peptidică sau nu, de exemplu nistatina, amfotericina, valinomicina, etc.) prezenți în membrană efectuează transportul unor ioni mici.

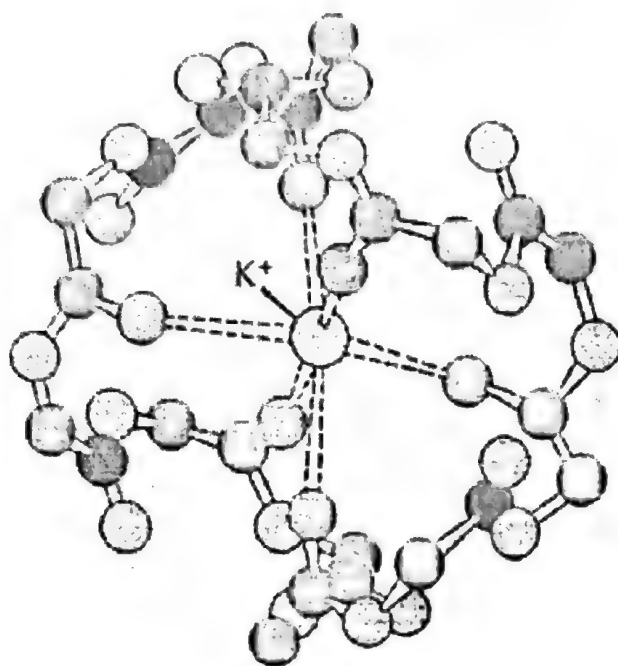


Figura 42.- Valinomicina realizează transportul ionoforic al ionului de potasiu prin biomembrane (după J. Darnell 1990)

În Figura 43 este redată o comparație între cele două tipuri de difuzie. Relația matematică ce se poate scrie pentru procesele de difuzie facilitată este de forma:

$$v(c) = \frac{cv_{\max}}{k_M + c} \quad (53)$$

unde: v este viteza de difuzie, c este concentrația, k_M este o constantă egală cu valoarea concentrației care reduce la jumătate viteza maximă de difuzie.

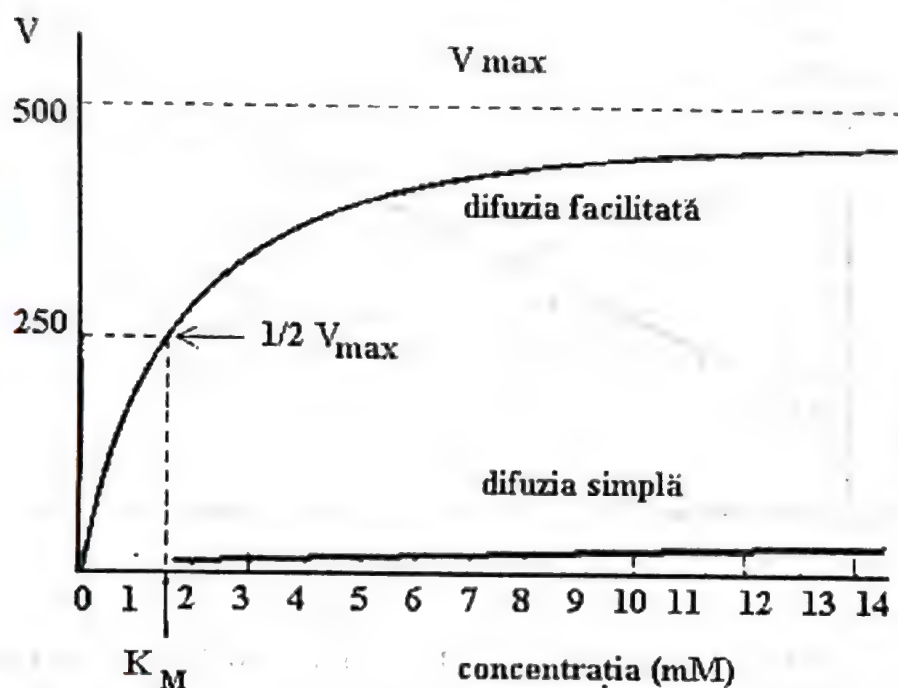


Figura 43. - Comparație grafică între difuzia simplă și difuzia facilitată

În formă inversată, relația este deosebit de ușor de verificat în experimente, deoarece conduce la o dependență lineară ce se stabilește prin metoda celor mai mici pătrate și permite calcularea parametrilor v_{max} și k_M din panta și tăietura la ordonată a dreptei (Figura 44) celei mai probabile:

$$\frac{1}{v(c)} = \frac{k_M}{v_{\max} c} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (54)$$

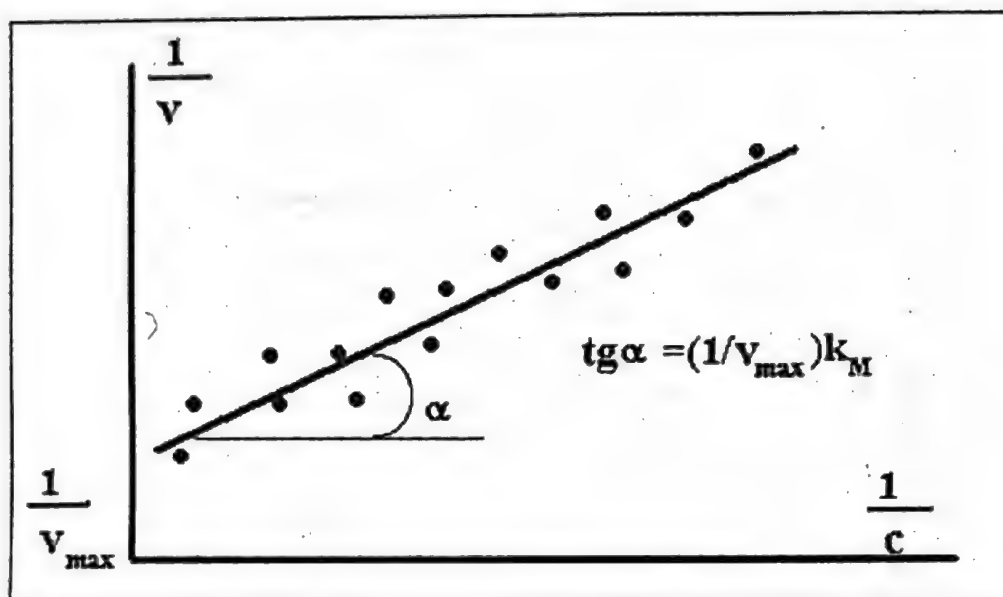


Figura 44. - Relația ce descrie difuzia facilitată poate fi adusă la formă lineară, convenabilă măsurărilor practice, prin inversarea relației dintre viteză și concentrație

Prin difuzie facilitată se explică transportul prin membrana eritrocitară, a anionilor moleculari de uree, glicerol și alți neelectroliți, transportul prin membrana musculară și epiteliul intestinal al glucozei și aminoacizilor, transportul glucidelor prin membranele microorganismelor.

10.5. Transportul activ

Un astfel de transfer de masă de tip microtransfer se efectuează împotriva gradientului electrochimic și se realizează pe baza energiei eliberate într-o reacție exergonică, cel mai frecvent fiind vorba de hidroliza legăturilor fosfat, acumulate de energie, din molecula de ATP.

10.5.1. Tipuri de transport activ

- *Transportul activ primar* implică deplasarea prin membrană a unor ioni mici care beneficiază în mod direct de energia eliberată în reacția ATP-ADP;

- *Transportul activ secundar* (Figura 45) asigură deplasarea unor ioni mici care beneficiază de modificarea de gradient electrochimic cauzată de transportul activ primar al altor tipuri de ioni mici. După cum ionii care se transportă pe baza energiei eliberate de hidroliza ATP-ului circulă în același sens sau în sens opus transportului activ primar, transportul activ secundar poate fi de tip *sinport* și respectiv *antiport*.

Tot o formă de transport activ este și *translocația de grup*, prin care structura unei molecule deplasată prin

membrană este modificată la nivelul unui grup de constituenți de atomi.

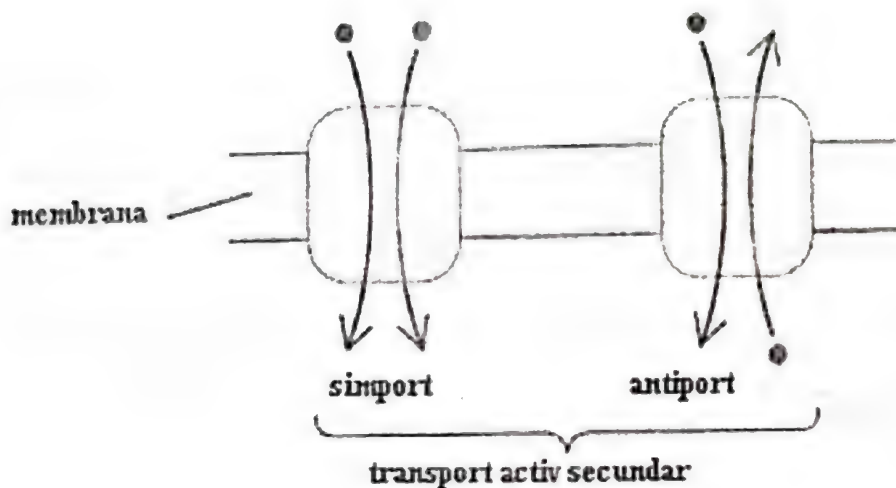


Figura 45. - Transportul activ secundar poate fi simport sau antiport (după J. Darnell și col. 1990)

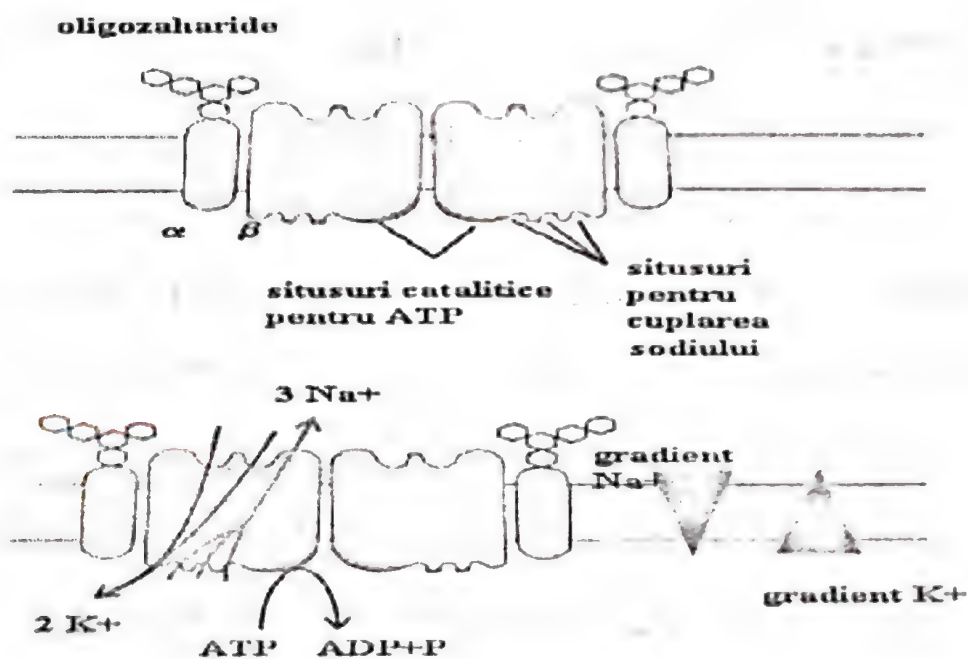


Figura 46. - Structura și rolul pompei de sodiu și potasiu (după J. Darnell și col. 1990)

10.5.2. Pompele ionice

Energia utilizată în transportul activ este eliberată ca urmare a activării unei enzime, *ATP* - *aza* membranară, care face parte din structura "pompelor ionice" de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , etc., numite și *ATP* - aze de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , etc.

Pompele ionice sunt denumite astfel deoarece "pompează" ionii în sens invers gradientului electrochimic în mod similar unei pompe care acționează pentru deplasarea unui fluid împotriva gradientului de presiune. Ele sunt agregate proteice, formate din mai multe subunități structurale care determină deplasarea ionilor în sens invers difuziei pasive.

• *ATP* - *aza* de Na^+ și K^+ prezintă (Figura 46) în membrana plasmatică (plasmalema) la majoritatea celulelor animale, asigură un eflux activ de sodiu și un influx activ de potasiu care pot contrabalansa influxul pasiv de sodiu și respectiv efluxul pasiv de potasiu (Figura 47), prin mobilizarea a circa 30% din *ATP* - ul destinat proceselor metabolice dintr-un organism animal aflat în repaus. Aceasta deoarece concentrația de sodiu ionic este mai mare în interiorul celulei decât în exterior în timp ce concentrația de potasiu este mai mare în interiorul celulei decât în mediul extracelular.

Raportul dintre numărul de ioni de sodiu și cel de potasiu, antrenati de pompa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (pompa ionică de sodiu și potasiu) este de 3/2. Pompa este blocată de ouabaină (F. Topoliceanu și I. Haulică 1965; F. Topoliceanu și I. Haulică 1972; F. Topoliceanu și I. Haulică 1975).

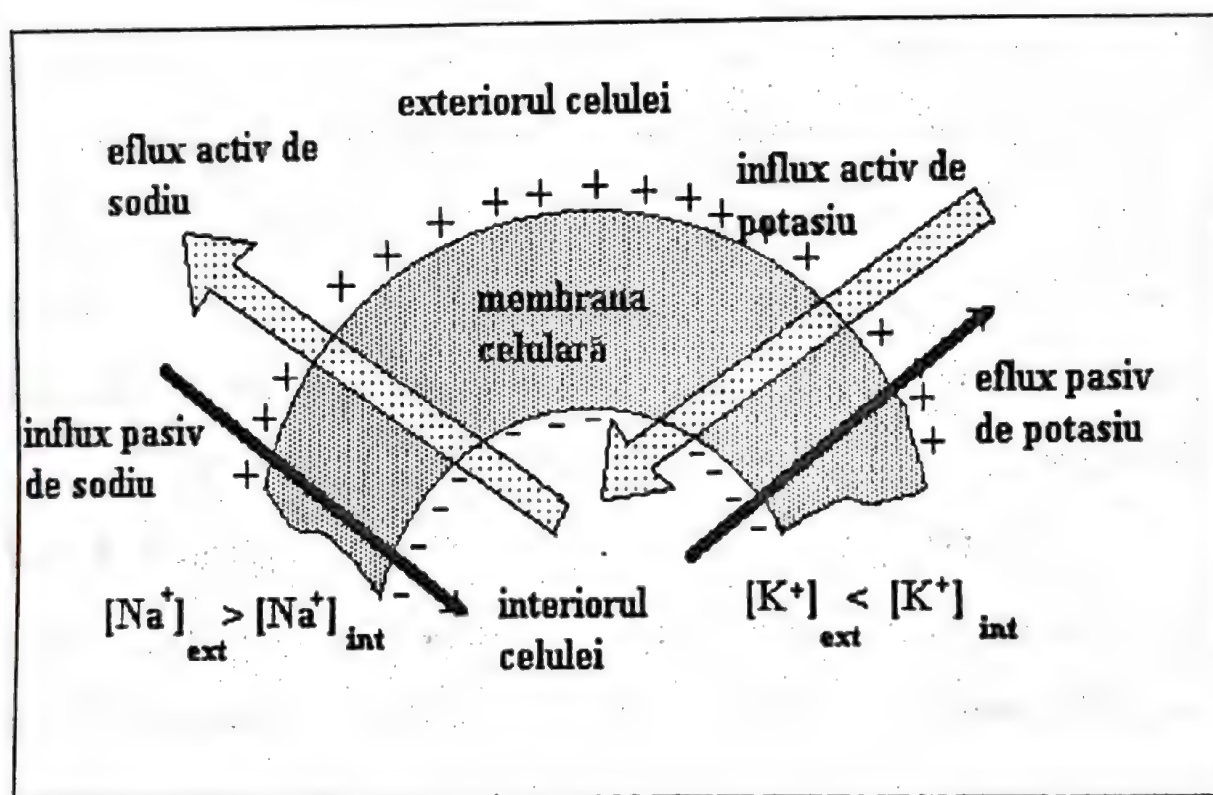


Figura 47. - Transportul pasiv și transportul activ printr-o biomembrană

La celulele renale s-au identificat cele mai multe astfel de pompe ionice precizându-li-se și structura tetramerică (dată de asocierea unei subunități cu proprietăți enzimatice, cu situsuri de legare a ionilor de sodiu la fața internă a membranei

- subunitatea α - și a unei subunități glicoproteice, cu situsuri de legare a ionilor de sodiu la fața externă a membranei - subunitatea β .

• *ATP - aza de Ca^{+2}* este bine reprezentată în membranele reticulului sarcoplasmic (reticulul endoplasmic din celulele musculare) - ionii de calciu având un rol important în bioelectrogenza celulei musculare.

• *ATP - aza de H^+ și K^+* este prezentă mai ales în plasmalema celulelor din mucoasa gastrică asigurându-se un eflux activ de protoni și un influx activ de ioni de potasiu.

Un caz mai aparte îl reprezintă *pompa de protoni* din membranele citoplasmatiche ale procariotelor și în membrana internă a mitocondriilor, care asigură realizarea efluxului de protoni simultan cu catalizarea fosforilării ADP-ului, reprezentând deci o ATP - sintetază, conform mecanismului propus de Mitchel (Benga 1976). Energia provine din procesele redox localizate în aceste tipuri de membrane și pe baza ei se deplasează protonii și se fosforilează ADP-ul.

• *Pompa de protoni bacteriană*, este mai puțin răspândită fiind localizată în membrana bacteriei *Halobacterium halobium* care utilizează energia luminoasă,

prin intermediul unei proteine de membrană numită bacteriorodopsină.

10.6. Ecuații diferențiale pentru descrierea cantitativă a bilanțului transportului activ și pasiv

Se consideră, pentru exemplificare, cazul ionilor de sodiu, la care se urmărește variația concentrației din mediul intracelular (din citoplasmă). Viteza de variație a concentrației intracelulare are două componente, cea pasivă și cea activă:

$$\frac{d[\text{Na}]_i}{dt} = \frac{d[\text{Na}]_i^p}{dt} + \frac{d[\text{Na}]_i^a}{dt} \quad (55)$$

Pentru explicarea fiecărei componente se are în vedere faptul că procesele de intruzie, respectiv extruzie a ionilor prezintă un caracter parțial stocastic, atât difuzia pasivă cât și transportul activ fiind, fiecare din ele, rezultanta unor intrări și ieșiri în și din celulă. Astfel, transportul pasiv transmembranar poate fi descris prin ecuația:

$$\frac{d[\text{Na}]_i^p}{dt} = k_1[\text{Na}]_e - k_2[\text{Na}]_i \quad (56)$$

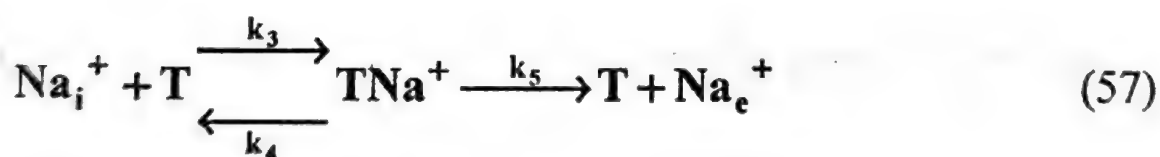
k_1 și k_2 fiind constantele de viteză (măsurate în s^{-1}) iar $[Na]_e$ și $[Na]_i$ fiind concentrațiile ionice în exteriorul și respectiv interiorul celulei.

Desigur că există relația: $k_1 > k_2$ după cum și $k_3 > k_4$ în cazul transportului activ, modelat fenomenologic și cantitativ după cum se poate vedea mai jos.

Acțiunea transportoare a pompei de Na^+ (Figura 48) este redată prin cuplarea reversibilă a acestui agregat proteic cu ionii de Na^+ (constantele de viteză fiind k_3 și k_4) și cedarea acestor ioni la fața externă a membranei (constanta de viteză fiind k_5).

În relațiile matematice care urmează se presupune că ionul și transportorul proteic formează un complex, notat.

Deci procesele care conduc la transportul activ se pot reprezenta schematic astfel:



Ecuatiile diferențiale corespunzătoare sunt de forma:

$$\begin{aligned}\frac{d[Na]_i}{dt} &= -k_3[T][Na]_i + k_4[TNa] \\ \frac{d[TNa]}{dt} &= k_3[T][Na]_i - k_5[TNa] - k_4[TNa]\end{aligned}\quad (58)$$

De aici și din ecuația diferențială a transportului pasiv se vede că:

$$\frac{d[Na]_i}{dt} = k_1[Na]_e - k_2[Na]_i - k_3[Na]_i[T] - k_4[TNa] \quad (59)$$

Notăm:

$$[Na]_i = x, [TNa] = y, [Na]_e = z \quad (60)$$

și, la momentul inițial, $t=0$, avem:

$$x(0)=x_0, y(0)=y_0, z(0)=z_0, \quad (61)$$

adică, tot sodiul ionic este prezent doar la interiorul celulei. Se poate considera, în baza conservării cantității totale de sodiu, în ipoteza unor volume egale, că:

$$z = (x_0 + y_0) - (x + y) \quad (62)$$

Sistemul de ecuații diferențiale ce urmează a se rezolva are forma:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= k_1 z - k_2 x - k_3 x[T] + k_4 y \\ \frac{dy}{dt} &= k_3 x[T] - (k_4 + k_5) y\end{aligned}\quad (63)$$

Folosind ecuația (62), variabila z se înlocuiește și se pot face notațiile:

$$\begin{aligned}c_1 &= k_1 + k_2 + k_3[T] \\ c_2 &= k_1 \\ c_3 &= k_4 - k_1 \\ c_4 &= k_4 + k_5 \\ c_5 &= k_3[T]\end{aligned}\quad (64)$$

Sistemul ia forma:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= -c_1 x + c_2 (x_0 + y_0) + c_3 y \\ \frac{dy}{dt} &= -c_4 y + c_5 x\end{aligned}\quad (65)$$

Pentru rezolvare se procedează la diferențierea ambelor ecuații în raport cu timpul:

$$\begin{aligned}\frac{d^2x}{dt^2} &= -c_1 \frac{dx}{dt} + c_3 \frac{dy}{dt} \\ \frac{d^2y}{dt^2} &= -c_4 \frac{dy}{dt} + c_5 \frac{dx}{dt}\end{aligned}\quad (66)$$

Din sistemele (65) și (66) se obțin ecuații cu câte o singură variabilă:

$$\begin{aligned}\frac{1}{c_3} \frac{d^2x}{dt^2} + \frac{c_1 + c_4}{c_3} \frac{dx}{dt} - \left(\frac{c_4 c_1}{c_3} + c_5 \right) x &= c_2 (x_0 + y_0) \frac{c_4}{c_3} \\ \frac{1}{c_5} \frac{d^2y}{dt^2} + \frac{c_4 + c_1}{c_5} \frac{dy}{dt} - \left(c_3 + \frac{c_1 c_4}{c_5} \right) y &= c_2 (x_0 + y_0)\end{aligned}\quad (67)$$

Se trece la ecuațiile caracteristice (în variabila r , de exemplu) ale căror soluții $r_1' = r_1 \equiv \alpha$, $r_2' = r_2 \equiv \beta$ sunt de forma:

$$r_{1,2} = \frac{1}{2} \left[-(c_1 + c_4) \pm \sqrt{(c_1 - c_4)^2 + c_3 c_5} \right] = r'_{1,2} \alpha, \beta \quad (68)$$

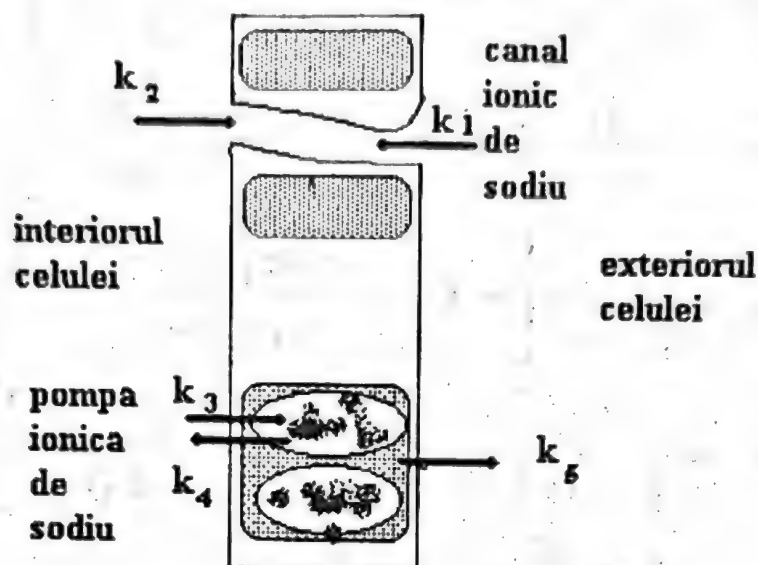


Figura 48. - Reprezentarea modelului bilanțului transportului pasiv și activ prin membrane biologice (după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Căutăm soluțiile de forma:

$$\begin{aligned} x &= x_1 + x_2 = A_1 e^{-\alpha t} + B_1 e^{-\beta t} + C_1 \\ y &= y_1 + y_2 = A_2 e^{-\alpha t} + B_2 e^{-\beta t} + C_2 \end{aligned} \quad (69)$$

Din condiția ca aceste sisteme să verifice sistemul de ecuații propus și din condițiile inițiale se obțin coeficienții de mai jos:

$$\begin{aligned}
 A_1 &= \frac{\beta}{\beta - \alpha} \left[x_0 - \frac{c_2 c_4 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5} \right] \\
 A_2 &= \frac{\beta}{\beta - \alpha} \left[x_0 - \frac{c_2 c_5 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5} \right] \\
 B_1 &= \frac{1}{\beta - \alpha} \left[-x_0 + \frac{c_2 c_4 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5} \right] \\
 B_2 &= \frac{1}{\beta - \alpha} \left[-x_0 + \frac{c_2 c_5 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5} \right] \\
 C_1 &= \frac{c_2 c_4 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5} \\
 C_2 &= \frac{c_2 c_5 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5}
 \end{aligned} \tag{70}$$

Cu aceste expresii ale coeficienților soluțiilor propuse se obțin relațiile ce dau dependențele de constantele de viteză și de concentrația de pompe ionice din membrană, ale concentrațiilor de ioni de sodiu la exteriorul membranei, la interiorul acesteia precum și concentrația de transportori cuplați cu ioni de sodiu.

Atât concentrațiile ionice cât și constantele de viteză se pot determina experimental prin metode bazate pe izotopi radioactivi, ceea ce a stat și la baza verificării aplicabilității

acestui model matematic în cazul membranei eritrocitare (F. Topoliceanu și col.1977).

Dintre preocupările cercetătorilor ieșeni asupra unor aspecte experimentale ale transportului activ, menționăm cercetările privind bazele electrochimice ale transportului transepitelial de sodiu (I. Haulică și F. Topoliceanu 1967; F. Topoliceanu și I. Haulică 1972), sau pe cele bazate pe utilizarea izotopilor radioactivi, (M. Isac și S. C. Bumbu 1979).

10.7. Structurile membranare semipermeabile și percolarea

Atât în cazul membranelor celulare cât și al structurilor membranare macroscopice porii permeabili pentru molecule mici sunt formațiuni caracterizate de o geometrie mai degrabă neregulată, în primul caz modelele cele mai frecvent utilizate sugerând continuitatea canaliculelor pe toată grosimea membranei dar și instabilitatea lor temporală, iar în al doilea caz, din contra, se admite constanța în timp a rețelei de pori dar și numeroase ramificații ale acestora între cele două fețe ale membranei.

Traseul apei și al altor molecule mici și ioni printr-o structură membranară macroscopică are, deci un caracter

impredictibil, deoarece nu se poate cunoaște prin care din ramificațiile canaliculare existente se deplasează fluxurile de ioni și molecule. Ceea ce se semnalează cu precizie este starea inițială și cea finală a fluidului ce se filtrează.

Odată cu dezvoltarea teoriilor moderne referitoare la determinismul ascuns sub o aparență haotică, fie a comportării temporale a unor sisteme complexe, fie a caracteristicilor geometrice ale unor obiecte, s-a dezvoltat și conceptul de *percolare*. Acest concept a fost introdus de matematicianul J.M Hammersley și inginerul S.R. Broadbend, în legătură cu fenomenul de filtrare a aerului printr-o mască de gaze. Cei doi cercetători urmăreau să stabilească în ce condiții o astfel de mască devine inutilizabilă prin colmatarea porilor săi, în speță, la ce procentaj de pori blocați funcția de filtrare nu se mai poate realiza. Ulterior s-a făcut analogia cu fenomenul de răspândire a unei epidemii într-o populație (de exemplu un parazit într-o livadă) și cu cel de răspândire a focului într-o pădure. În majoritatea cazurilor se urmărea o estimare cantitativă a pragului de realizare a fenomenului în vederea controlării lui.


Semnificativ este faptul că structurile la nivelul cărora se înregistrează fenomenul de percolare par să aibă caracteristici geometrice *fractale* sau, cum se mai poate spune, să prezinte aceleași caracteristici geometrice indiferent de scara

la care se efectuează observarea lor. În cazul rețelei de canalicule ce se poate asocia porilor ramificați ai unei structuri membranare macroscopice, estimarea caracterului fractal, chiar dacă nu oferă posibilitatea unei descrieri matematice cantitative, lasă loc totuși acceptării unei predictibilități limitate a traseelor disponibile pentru transportul ionilor, apei și altor molecule mici. De remarcat că același *caracter fractal* se atribuie și organizării intime a *țesutului pulmonar*.

CAPITOLUL 11

Biofizica bioelectrogenezei celulare

Prin bioelectrogeneză se înțelege fenomenul complex, omniprezent în structurile materiei vii, prin care este generată o diferență de potențial electric, cu rol de asigurare a unei stări electrice caracteristice (potențiale electrice de repaus) sau de modificare a stării electrice de repaus ca urmare a acțiunii unor stimuli (potențiale de acțiune).



Caracterizarea stării electrice a unor celule, țesuturi sau organe, impune identificarea unor parametri electrici de tip capacitiv, disipativ (rezistiv), inductiv și studiul dependenței lor de starea fiziologică precum și de alți parametri fizico-chimici (pH, grad de ionizare, etc.).

Un organism viu se comportă ca un conductor de ordinul II (ionic), neomogen și anizotrop, căci distribuția volumică de sarcini electrice elementare este neuniformă în timp și de-a lungul direcțiilor spațiale de referință.

Bioelectrogeneza celulară este determinată în principal de asimetria distribuției ionice de o parte și de alta a membranei

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

celulare (plasmalema), între cauzele determinante ale acestei asimetrii electrice se numărându-se în primul rând:

- concentrațiile diferite de ioni mici de la nivelul celor două fețe ale membranei, mai ales a cationilor mici (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) aflați atât în mediul extracelular cât și în mediul intracelular;
- prezența anionilor macromoleculari, nedifuzibili, din mediul intracelular;

prezența la exteriorul membranelor a unor concentrații semnificative de resturi anionice de molecule de acid sialic care aparțin terminațiilor glucidice ale unor glicoproteine din structura membranei.

Fața externă ca și cea internă a membranei celulare prezintă o încărcare electrică permanentă, caracterizată de potențiale electrice diferite la exteriorul (V_e) și respectiv la interiorul (V_i) celulei. În principiu ambele potențiale sunt negative dar inegale astfel că și potențialul electric de membrană, care se măsoară de la interior spre exterior, este și el, prin convenție, negativ:

$$\begin{aligned} V_e < 0, V_i < 0 \\ V = V_i - V_e < 0 \end{aligned} \quad (71)$$

căci între valorile absolute ale potențialelor V_e și V_i există relația:

$$|V_e| > |V_i| \quad (72)$$

În cazul celulelor excitabile (celulele musculare, nervoase, vizuale) potențialul electric de membrană poate să varieze foarte mult în timpul acțiunii stimulilor specifici, când apar așa numitele potențiale de acțiune - variații ale potențialelor de repaus care pot fi depolarizări sau hiperpolarizări electrice ale membranei.

11.1. Modele electrice pentru membrana excitabilă

Pentru modelarea proprietăților electrice ale membranei celulare s-au propus diferite variante de circuite electrice, bazate, în principal, pe elemente capacitive și elemente rezistive de circuit. Elementele capacitive reflectă proprietățile de izolator electric conferite de bistratul lipidic în timp ce elementele disipative de energie (rezistive) descriu proprietățile de permeabilitate ale membranei pentru ioni, permeabilitate al cărei suport molecular îl constituie agregatele proteice de tipul

canalelor și pompelor ionice precum și porii membranari. Existența dublului strat de sarcini electrice - prin convenție pozitive la exteriorul membranei și negative în interior - datorită căruia există componenta electrică a gradientului de potențial electrochimic, permite analogia cu acțiunea unei surse de tensiune electromotoare în circuitul electric echivalent al membranei.

Așadar, pentru unitatea de suprafață a membranei, avem un circuit echivalent de forma (Figura 49):

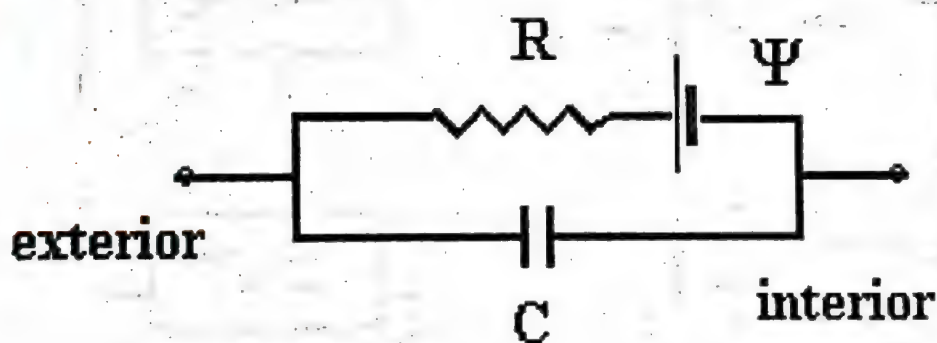


Figura 49. - Proprietățile electrice ale unității de suprafață a membranei excitabile (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

unde: *valoarea capacității* este de circa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, *valoarea rezistenței* pe unitatea de lungime este de circa $1000 \Omega\text{cm}^2$ iar *potențialul de repaus* al membranei, Ψ , este cuprins între 50mV și - 90 mV.

În mod similar, proprietățile conductoare de electricitate ale mediului interior precum și ale celui exterior celulei sunt reprezentate schematic prin rezistențele unității de lungime, r_i și r_e .

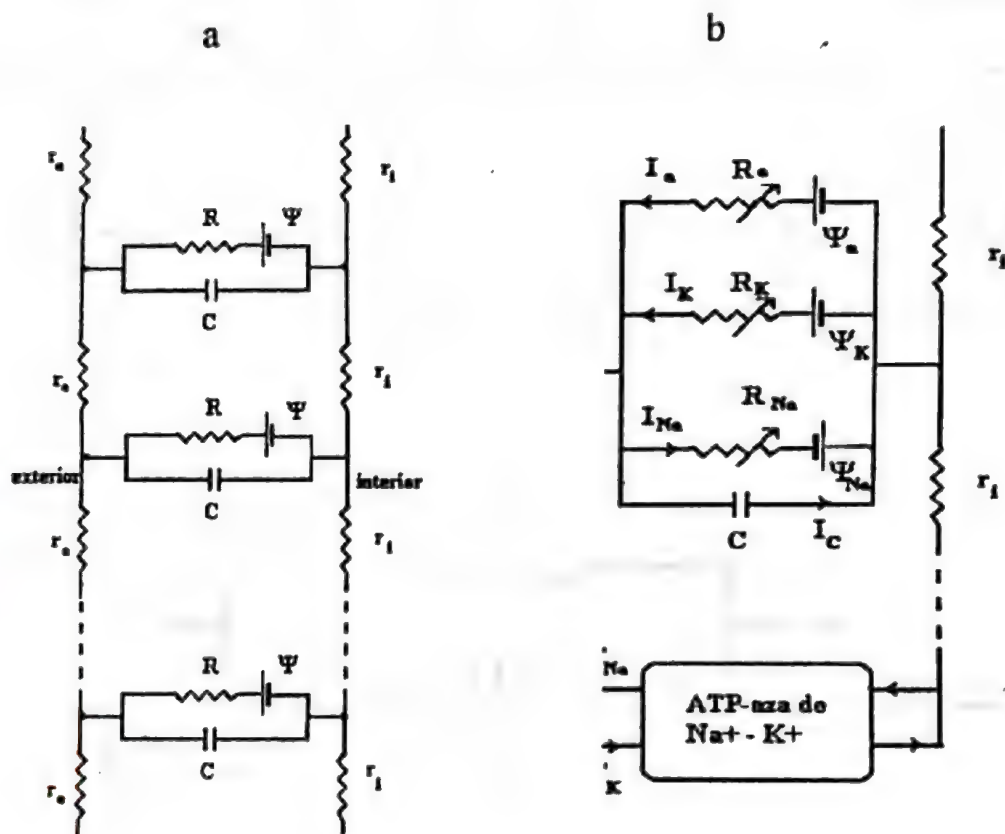


Figura 50. - Scheme electrice echivalente pentru proprietățile electrice capacitive și rezistive ale membranei unei celule excitabile ; a - proprietățile capacitive și rezistive constante, în aproximația transportului ionic exclusiv pasiv; b - proprietățile capacitive și rezistive variabile, în aproximația independenței transportului pasiv de sodiu, potasiu și alți ioni precum și în ipoteza transportului activ de sodiu și potasiu (F. Gremy și J. Perrin 1975)

Membrana axonală a celei mai reprezentative celule excitabile, celula neuronală, poate fi astfel reprezentată printr-o

serie de unități repetitive cu proprietăți electrice disipative (rezistive), capacitive și respectiv generatoare de diferență de potențial electric (Figura 50).

11.2. Potențialul de difuzie

Fluxul, f , de ioni caracterizați de sarcina electrică z și mobilitatea m , este determinat de gradientul de concentrație dC/dx și de gradientul de potențial electric $d\Psi/dx$, caracteristice membranei străbătute:

$$f = -m \left(RT \frac{dC}{dx} + zFC \frac{d\Psi}{dx} \right) \quad (73)$$

unde: R este constanta gazelor perfecte, T este temperatura absolută, F este constanta lui Faraday. Pentru potențialul de membrană evaluat teoretic va fi utilizată notația Ψ iar pentru cel real, măsurabil experimental, notația V . Odată ce un număr de ioni a trecut dintr-un compartiment în altul, se modifică gradientul de concentrație (se reduce) ca și distribuția de sarcină electrică și deci și gradientul electric. La echilibru fluxul se anulează și avem:

$$\frac{d\Psi}{dx} = \frac{RT}{zFC} \frac{dC}{dx} = \frac{RT}{zF} \frac{d(\ln C)}{dx} \quad (74)$$

Integrând între două puncte ce limitează grosimea l a membranei obținem ecuația lui Nernst:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_1}{C_2} \quad (75)$$

unde: $\Delta\Psi$ este $\Psi_2 - \Psi_1$ între cele două puncte de pe o față și de pe cealaltă a membranei.

Dacă prin membrană difuzează (Figura 51) și cationi și anioni atunci condiția de echilibru implică anularea fluxului rezultat al celor două fluxuri. Fie l grosimea membranei și fie $[i^-(0)]$, $[i^-(l)]$, $[i^+(0)]$, $[i^+(l)]$ valorile concentrațiilor de anioni (de exemplu Cl^-) și respectiv cationi (de exemplu Na^+) în $x=0$ și în $x=l$, sau, pentru un tip oarecare de ioni, fie aceste concentrații $[C(0)]$ și $[C(l)]$.

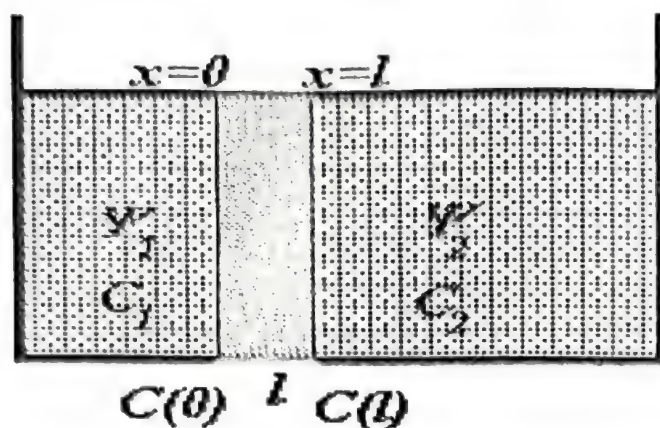


Figura 51. - Sistem cu două compartimente, cu concentrațiile ionice C_1 și C_2 și potențialele electrice Ψ_1 și Ψ_2 separate de o membrană de grosime l (după J. Darnell)

Dacă notăm:

$$b = \frac{-f}{mRT}, a = \frac{zF}{RT} \frac{d\Psi}{dx} \quad (76)$$

atunci: pentru dependența concentrației de distanța de difuzie se obține, indiferent de tipul de ioni urmărit:

$$\frac{dC(x)}{dx} + aC(x) = b \quad (77)$$

rezultă o ecuație diferențială neomogenă de ordinul întâi, care, prin integrare, duce la:

$$C(x) = \frac{b}{a} + ct \cdot e^{-ax} \quad (78)$$

unde: ct este constanta de integrare. Din condițiile inițiale și introducând o nouă notație simplificatoare, $C_{l,0}$ obținem:

$$b = a \frac{[C(l)] - [C(0)]e^{-al}}{1 - e^{-al}} = aC_{l,0} \quad (79)$$

Reconsiderând notațiile a și b rezultă:

$$f = -mzFC_{l,0} \frac{d\Psi}{dx} \quad (80)$$

Revenind la cazul moleculei de NaCl disociată în ioni în mediu apos, de exemplu, vom avea:

$$\begin{aligned} f_{i+} &= -m_{i+} F [i^+_{l,0}] \frac{d\Psi}{dx} \\ f_{i-} &= -m_{i-} F [i^-_{l,0}] \frac{d\Psi}{dx} \end{aligned} \quad (81)$$

unde: notațiile $[i^+_{l,0}]$ și $[i^-_{l,0}]$ sunt particularizări ale notației $C_{l,0}$ pentru anionii și respectiv cationii difuzibili. Din egalitatea cu zero a fluxului rezultat rezultă:

$$e^{a/l} = \frac{m_{i+} [i_0^+] - m_{i-} [i_l^-]}{m_{i+} [i_l^+] - m_{i-} [i_0^-]} \quad (82)$$

adică: în aproximația unei variații liniare a potențialului electric în membrana de grosime l (grosimea membranei se reduce de la numitorii egalității următoare):

$$\frac{d\Psi}{dx} = \frac{\Delta\Psi}{l} = \frac{RT}{Fl} \ln \frac{m_{i+} [i_0^+] - m_{i-} [i_l^-]}{m_{i+} [i_l^+] - m_{i-} [i_0^-]} \quad (83)$$

Dacă există mai multe tipuri de cationi și mai multe tipuri de anioni monovalenți atunci:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_{\alpha} m_{\alpha i+} [i_{\alpha 0}^+] - \sum_{\beta} m_{\beta i-} [i_{\beta l}^-]}{\sum_{\alpha} m_{\alpha i+} [i_{\alpha l}^+] - \sum_{\beta} m_{\beta i-} [i_{\beta 0}^-]} \quad (84)$$

unde: α și β sunt indici de sumare pentru tipurile de cationi și respectiv de anioni. Particularizând pentru o membrană biologică, prin care difuzează două tipuri principale de cationi

monovalenți, Na^+ și K^+ precum și un tip de anion monovalent, Cl^- , din relația de mai sus se obține potențialul de membrană:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_1 + P_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_1 + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_2}{P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_2 + P_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_2 + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_1} \quad (85)$$

unde s-au introdus permeabilitățile membranei pentru ioni difuzibili, P_{K^+} , P_{Na^+} și P_{Cl^-} .

$$\begin{aligned} P_{\text{Na}^+} &= \frac{z_{\text{Na}^+} K_{\text{mNa}} + RTm_{\text{Na}^+}}{l} \\ P_{\text{K}^+} &= \frac{z_{\text{K}^+} K_{\text{mK}} + RTm_{\text{K}^+}}{l} \\ P_{\text{Cl}^-} &= \frac{z_{\text{Cl}^-} K_{\text{mCl}} - RTm_{\text{Cl}^-}}{l} \end{aligned} \quad (86)$$

Indicii 1 și 2 corespund interiorului și respectiv exteriorului membranei. Sarcinile electrice ionice sunt egale cu unitatea (diferă doar semnul) iar K_{mNa^+} , etc. sunt coeficienți de partiție a concentrațiilor ionice între membrană și spațiul intra sau extracelular, considerați, pentru simplificare, egali cu unitatea (concentrația fiecărui tip de ioni este nemodificată la trecerea din spațiul exterior membranei la porțiunea de

membrană imediat adiacentă, adică gradientul de concentrație este strict localizat pe grosimea membranei).

Coeficienții de difuzie, D , se pot regăsi în forma produselor dintre factorul RT și mobilitățile fiecărui tip de ioni prin membrana considerată:

$$\begin{aligned} D_{Na^+} &= RTm_{Na^+} \\ D_{K^+} &= RTm_{K^+} \\ D_{Cl^-} &= RTm_{Cl^-} \end{aligned} \quad (87)$$

Evaluările experimentale efectuate cu ajutorul izotopilor radioactivi pentru urmărirea fluxurilor ionice, ca și măsurătorile electrice directe realizate cu ajutorul electrozilor intracelulari, au dat valori de -50 mV până la -90 mV pentru potențialul de membrană la diferite tipuri de biomembrane.

11.3. Echilibrul Donnan

În cazul membranelor celulare precum și în cazul altor biomembrane din organisme animale (epiteliul intestinal, pereții vaselor sangvine, membranele alveolelor pulmonare, ș.a.) există o modificare semnificativă a echilibrului ionilor mici, determinată de prezența ionilor macromoleculari,

nedifuzibili, rezultați din disocierea unor particule coloidale de natură proteică, etc. (I. Haulică și col. 1984; I. Haulică și col. 1992; I. Haulică și col. 1998).

Adesea este vorba de *anioni nedifuzibili* care aparțin doar unuia dintre cele două compartimente ale modelului bicompartimental cu membrane semipermeabile, discutat anterior.

Dacă numai în primul compartiment, există anioni nedifuzibili, cu n sarcini elementare fiecare, în concentrație de $[P^-]_1$ iar concentrațiile de anioni și cationi mici *monovalenți* din cele două compartimente sunt $[a^-]_1$, $[c^+]_1$, $[c^+]_2$, atunci neutralitatea electrică a fiecărui compartiment se transpune cantitativ astfel:

$$\begin{aligned} [c^+]_1 &= [a^-]_1 + n[P^-]_1 \\ [c^+]_2 &= [a^-]_2 \end{aligned} \quad (89)$$

Condițiile ca la echilibru să se anuleze fluxurile de cationi și anioni mici conduc la expresiile potențialului de membrană:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[c^+]_1}{[c^+]_2} \quad (90)$$

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[c^-]_2}{[c^-]_1} \quad (91)$$

de unde rezultă: *ecuația Donnan*:

$$[c^+]_1 \cdot [c^-]_2 = [c^+]_2 \cdot [c^-]_1 \quad (92)$$

În cele prezentate este luat în considerație numai transportul pasiv al ionilor, formulele obținute referindu-se la *potențialul de repaus* (în lipsa acțiunii unor stimuli asupra unor celule excitabile)

11.4. Potențialul de acțiune neuronal

Generarea *potențialului de acțiune* – la nivelul membranei neuronale cuprinde ansamblul modificărilor suferite de potențialul electric de membrană, sub influența unui stimul umoral (depolarizarea acetilcolinică a membranei postsinaptice) sau electric, de intensitate superioară pragului de excitație. În dezvoltarea lui, excitarea se realizează între două puncte

apropiate, printr-un microelectrod (cu arie foarte mică, 'punctiformă' a secțiunii transversale) și un electrod de suprafață (cu arie relativ mare față de electrodul 'punctiform') între care se aplică un puls rectangular de tensiune electrică, $V_E - V_S$. Între același electrod de suprafață și un alt microelectrod plasat în imediata lui apropiere se recepționează variația de tensiune $V_S - V_A$ generată de celula neuronală - măsură directă a potențialului electric de acțiune a membranei sale. Se obține un răspuns electric de formă caracteristică la care se disting mai multe faze (Figura 52). Întâi este recepționat un *prepotențial* (porțiunea de curbă notată *ab*), apoi se înregistrează așa numitul *spike* (*bcd*) - variația cea mai amplă din cadrul acestui fenomen care este urmat de un postpotențial negativ (*de*) și un postpotențial pozitiv (*ef*). Cel mai adesea potențialul de acțiune este în principal o depolarizarea electrică a membranei, dar la unele celule vizuale poate fi în principal o hiperpolarizare.

Prepotențialul este o variație locală a potențialului de repaus care precede apariția spike-ului. În funcție de sensul și intensitatea curentului electric de excitație, I , potențialul de membrană poate suferi o variație mai mare sau mai mică, de accentuare sau diminuare a stării de polarizare electrică caracteristică repausului (lipsei excitației), care constituie

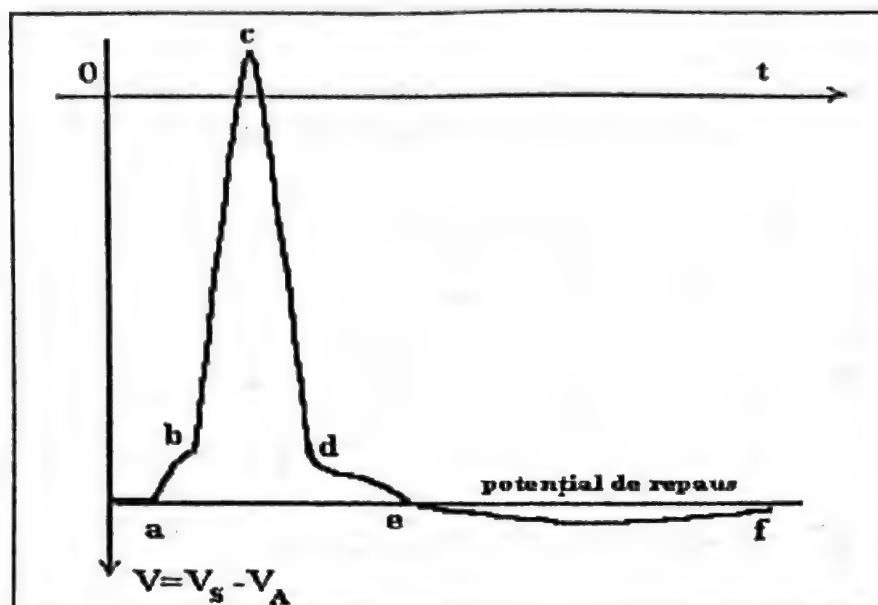


Figura 52.- Forma generală a unui potențial de acțiune: *prepotențial* (ab), *spike* -ul (bcd), postpotențialul negativ (de) și postpotențial pozitiv (ef) (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

prepotențialul și care nu este urmată de *spike* dacă nu se depășește pragul de excitație. Astfel în cazul (1) potențialul de membrană suferă o accentuare a polarizării căci microelectrodul este electrodul negativ și electrodul de suprafață este electrodul pozitiv - curent de excitație negativ. În schimb, în cazul (2), inversându-se polaritatea celor doi electrozi, curentul de excitație este pozitiv și potențialul de membrană este diminuat dar nu apare și un *spike*, excitația fiind sub nivelul pragului. Abia în cazurile (3) și (4), curenți de același sens cu (2) dar de intensitate egală și respectiv mai mare decât cea a pragului, induc depolarizări de membrană care conțin un prepotențial și un *spike*. Sunt motive să se presupună

că generarea prepotențialului nu este numai o manifestare a proprietăților conductoare pasive ale membranei dar și a variațiilor de permeabilitate ionică induse de acțiunea stimulului, mai ales când acesta se apropie mult de valoarea pragului de excitație. *Spike*-ul are aceeași intensitate indiferent de intensitatea curentului de excitație cu condiția ca să fie depășită limita pragului de excitație (Figura 53). Ceea ce diferă în cazurile (3) și (4) este *latența* adică intervalul de timp după care se înregistrează componenta principală a potențialului de acțiune - *spike*-ul. La o intensitate mai mare a excitației, latența este mai scurtă și invers.

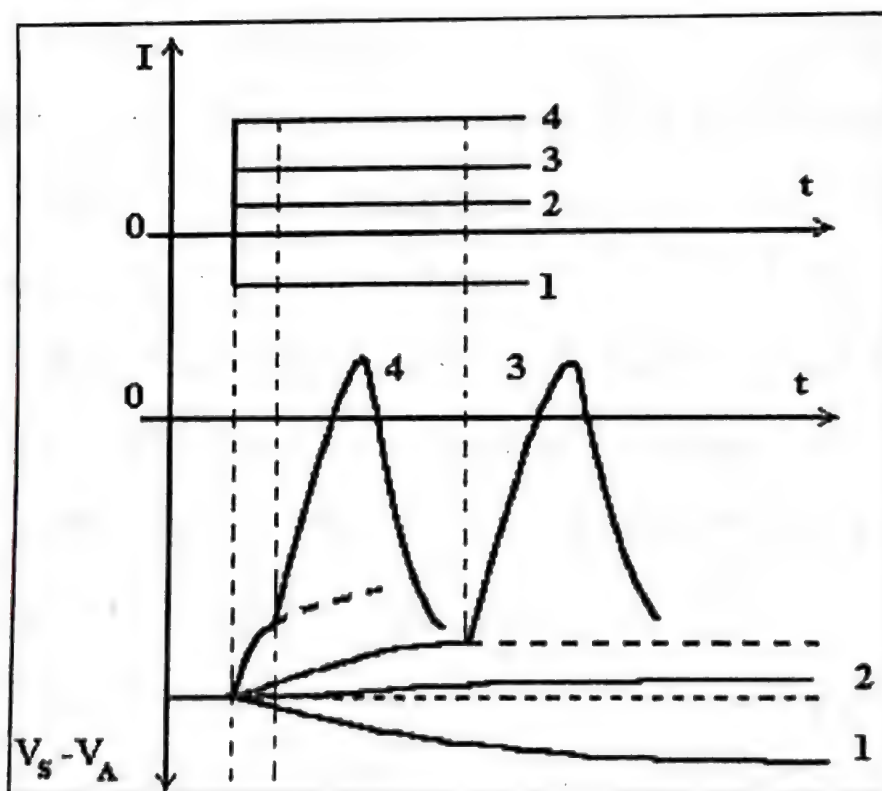


Figura 53 - Curenții de excitație $I(t)$ și potențialele de membrană induse $V(t)$ (după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Potențialul de acțiune propriu-zis, *spike-ul*, reprezintă variația rapidă de potențial de membrană care se produce sub acțiunea unui stimul de intensitate suficient de mare pentru a depăși pragul de excitație. Amplitudinea acestei variații poate să însemne chiar o inversare a sensului polarității membranei. Ea nu depinde de intensitatea stimulului, dacă acesta a depășit pragul de excitație, deci se supune legii *totul sau nimic*.

Postpotențialul este considerat ca rezultanta a două faze, un postpotențial de același sens cu potențialul de acțiune propriu-zis și un potențial de sens opus care are o durată mai mare. Amplitudinea primei faze poate avea valori de la câțiva milivolți în axonul gigant al calmarului (axon nemielinizat) până la câteva zeci de milivolți în fibra musculară, în fibra miocardică fiind comparabilă chiar cu cea a *spike-ului*. Durata primei faze este de ordinul zecilor de milisecunde la fibra nervoasă mielinizată și de circa 200 milisecunde la fibra miocardică, în timp ce durata celei de-a doua faze poate atinge chiar o secundă - dar amplitudinea acesteia din urmă este, de regulă, sub 1 milivolt (mV).

11.4.1. Propagarea potențialului de acțiune

Propagarea potențialului de acțiune se concretizează în principal în propagarea spike-ului care realizează conducerea excitației în lungul fibrei. Se consideră o fibră nervoasă nemielinizată, cum este cazul, de exemplu, la axonul gigant de calmar, material biologic foarte mult utilizat în studii de excitabilitate celulară. Stimularea experimentală se realizează cu o pereche de electrozi dintr-un circuit electric de tensiune continuă.

Mecanismul acestei propagări poate fi reprezentat prin intermediul modificărilor de distribuție de sarcină electrică pe fețele membranei celulare ca urmare a aplicării stimulului excitant între două puncte apropiate ale acestei membrane. Astfel se consideră că excitarea locală este echivalentă cu inversarea semnului sarcinii electrice adică o inversie de potențial electric (plus la exterior și minus la interior (Figura 54).

Tendința de compensare a acestei perturbări de sarcină electrică se manifestă prin apariția unor curenți electrici locali și la interiorul și la exteriorul fibrei având rolul de diminuare a diferenței de potențial de membrană din zona excitată. Acești

curenți sunt fluxuri de ioni mici pozitivi, prezenți întotdeauna la ambele fețe ale membranei.

Deplasarea ionilor pozitivi de la fața externă a membranei dinspre zonele cu încărcare pozitivă spre zona excitată, cu încărcare negativă la exteriorul membranei, produce apariția spike-ului (când potențialul ajunge la limita pragului de excitabilitate). Propagarea excitației se produce în ambele sensuri, fără modificarea amplitudinii spike-ului (propagare fără decrement), cu o viteză cu atât mai mare cu cât diametrul fibrei nervoase este mai mare (Figura 55).

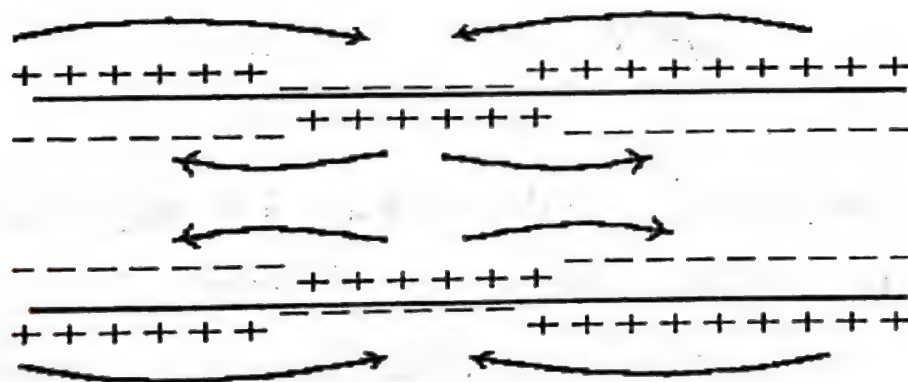


Figura 54.- Inversarea polarizării electrice a membranei excitabile determină apariția unor curenți de sarcini ionice pozitive care tind să compenseze perturbarea electrică produsă (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Teoria cablului coaxial demonstrează că proprietățile conductoare ale acestuia (în condițiile în care, între două puncte se aplică o diferență de potențial ce nu depășește pragul de

excitabilitate), depind numai de doi parametri, cunoscuți sub denumirile de constanta de timp, τ , și constanta spațială, λ .

$$\begin{aligned}\tau &= RC \\ \lambda &= \sqrt{\frac{R}{r_i + r_e}}\end{aligned}\quad (93)$$

Constanta de timp descrie variația în timp a potențialului de membrană dintr-un punct considerat, față de valoarea de la un anumit moment inițial, pe durata propagării electrotonice a curentului generat de diferența de potențial aplicată:

$$\Psi(t) = \Psi_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (94)$$

Constanta spațială descrie variația în lungul cablului a acestui potențial electrotonic, adică a diferenței de potențial dintre fețele membranei, fără declanșarea potențialului de acțiune, față de un punct considerat inițial:

$$\Delta\Psi(x) = \Delta\Psi_0 e^{-\frac{x}{\lambda}} \quad (95)$$

Dacă aplicarea pulsului de tensiune stimulator se efectuează la momentul $t=0$, atunci în acest moment diferența

de tensiune între două puncte separate prin distanța dx este dată de curentul transmembrantar și rezistențele pasive corespunzătoare celor două fețe ale membranei (după Hughes 1979, citat de V. Gheoghe și A. Popescu 1990):

$$I_M = \frac{1}{R_e + R_i} \frac{d^2 \Psi_M}{dx^2} \quad (96)$$

Ecuția undelor cu propagare unidimensională (pe o direcție OX) poate descrie destul de bine propagarea excitației, după cum au arătat măsurătorile experimentale în comparație cu valorile obținute computațional, unde potențialul de membrană este o funcție de distanță și timp.:

$$\frac{d^2 \Psi(x, t)}{dx^2} = \frac{1}{v^2} \frac{d^2 \Psi(x, t)}{dt^2} \quad (97)$$

Descrierea cantitativă a circulației ionilor mici prin membrana axonală în timpul generării și propagării potențialului de acțiune (excitația sau impulsul electric care depășește pragul de excitație), se poate face cu ajutorul legilor de bază ale circuitelor electrice (legile lui Ohm).

Astfel, în *modelul lui Hodgkin și Huxley*, pentru fiecare din cele trei categorii de ioni se pot scrie relațiile de legătură între intensitățile curenților pasivi (I) și diferențele de tensiune electrică generatoare (Ψ):

$$I_{Na} = \frac{\Psi - \Psi_{Na}}{R_{Na}}, I_K = \frac{\Psi - \Psi_K}{R_K}, I_a = \frac{\Psi - \Psi_a}{R_a} \quad (98)$$

unde: Ψ este potențialul de membrană, iar R_{Na} , R_K , R_a sunt rezistențele membranei pentru fiecare categorie de ioni.

Curentul ionic total prin membrană, I_M , are și o componentă capacitivă:

$$I_M = C_M \frac{d\Psi}{dt} + I_{Na} + I_K + I_a$$

$$I_M = C_M \frac{d\Psi}{dt} + \frac{\Psi - \Psi_{Na}}{R_{Na}} + \frac{\Psi - \Psi_K}{R_K} + \frac{\Psi - \Psi_a}{R_a} \quad (99)$$

Pentru caracterizarea variabilității rezistenței electrice în funcție de potențialul de membrană s-au propus mai multe variante dintre care, cea care descrie, *formal*, cel mai bine acest fenomen - în cea mai bună concordanță cu datele experimentale - este redată mai jos (se preferă conductanța, g , adică inversul rezistenței, pentru a da o imagine mai sugestivă proprietăților

de permeabilitate membranară). Curentul prin membrană va fi atunci de forma:

$$I_M = C_M \frac{d\Psi}{dt} + g_{Na}(\Psi - \Psi_{Na}) + g_K(\Psi - \Psi_K) + g_a(\Psi - \Psi_a) \quad (100)$$

Pentru *sodiu* sunt propuse ecuațiile:

$$\begin{aligned} g_{Na}(t) &= g_{Na}^0 m^3(t) h(t) \\ \frac{dm}{dt} &= \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h (1 - h) - \beta_h h \end{aligned} \quad (101)$$

unde: $m(t)$ și $h(t)$ sunt funcții exponențiale temporale la un potențial dat, după cum rezultă din integrarea ecuațiilor diferențiale (D. G. Mărgineanu, 1976), iar α_m , α_h , β_m și β_h sunt constantele de viteză corespunzătoare variațiilor funcțiilor $m(t)$ și $h(t)$ care, la un potențial fixat, au valori constante. Valoarea maximă a conductanței pentru sodiu este notată g_{Na}^0 .

Pentru *potasiu* este dată o relație ce depinde de o altă funcție temporală, $n(t)$:

$$\begin{aligned} g_K(t) &= g_K^0 n^4(t) \\ \frac{dn(t)}{dt} &= \alpha_n (1 - n) - \beta_n n \end{aligned} \quad (102)$$

Constantele de viteză α_n și β_n corespund variației în timp a funcției $n(t)$ și, la o concentrație dată de ioni de calciu, precum și la o temperatură dată, depind numai de potențialul electric de membrană.

Parametrii $m(t)$, $h(t)$, $n(t)$ pot fi considerați ca descriind acțiunea unor factori neprecizați ca natură, ce controlează activarea canalelor ionice de Na (parametrul m), de K (parametrul n) și respectiv inactivarea canalelor de Na (parametrul h).

De exemplu, deschiderea canalului pentru K^+ ar putea fi condiționată de prezența a patru sarcini electrice negative elementare, purtate de particule ipotetice, mobile sub acțiunea câmpului electric. În aceste condiții, $n(t)$ ar avea semnificația fizică a probabilității ca prezența uneia din cele patru sarcini să condiționeze independent deschiderea canalului de potasiu, $n^2(t)$ ar fi probabilitatea ca această activare să fie condiționată de prezența a două sarcini electrice negative, etc.

Într-o interpretare bazată pe simetrie, $n^2(t)$ ar putea avea semnificația probabilității, ca activarea canalului de potasiu să

fie controlată de absența din apropierea suprafeței membranare a unui ion bivalent pozitiv (de ex.: ionul de calciu).

În cazul ionului de sodiu, în mod analog, se poate presupune că activarea este declanșată de prezența a trei sarcini electrice elementare astfel că parametrul $h(t)$ dobândește semnificația probabilității ca în apropierea canalului să se afle una din aceste particule.

Pentru celelalte tipuri de ioni (cum ar fi clorul ș.a.) conductanța, g_a , este presupusă constantă.

Dependența de timp a intensității curentului ionic prin membrană apare ca o relație de parametrii m , n , h care modulează conductanțele ionice pentru sodiu și potasiu:

$$I_M(t) = C_M \frac{d\Psi}{dt} + (\Psi - \Psi_{Na}) g_{Na}^0 m^3(t) h(t) + (\Psi - \Psi_K) g_K^0 n^4(t) + (\Psi - \Psi_a) g_a \quad (103)$$

Acest model conduce la graficul de variație în timp a potențialului de membrană precum și a conductanțelor ionice pentru sodiu și potasiu, ca rezultat al integrării ecuațiilor diferențiale propuse.

Limitele acestui model, sugerate chiar de aproximațiile în care este formulat, decurg și din necesitatea de a preciza mecanismele de activare a diferitelor tipuri de canale ionice

precum și din restricția, ca fiecare tip de ion să circule prin canal separat (în realitate existând și canale ionice pentru două tipuri de ioni).

Luând în considerare și rezultatele teoriei cablului coaxial, *modelul Hodgkin și Huxley*, poate descrie variația temporară a potențialului de membrană într-un punct considerat, ca urmare a acțiunii unui stimul care depășește pragul de excitabilitate (Figurile 56 și 57):

$$\frac{1}{(R_e + R_i)} \frac{d^2 \Psi}{dt^2} = C_M \frac{d\Psi_M}{dt} + (\Psi - \Psi_{Na}) g_{Na}^0 m^3(t) h(t) + (\Psi - \Psi_K) g_K^0 n^4(t) + (\Psi - \Psi_a) g_a \quad (104)$$

11.5. Fluxuri ionice și electrogeneză în fibra musculară

11.5.1. Potențialul de acțiune în fibra musculară

cardiacă și netedă

În cazul fibrei musculare cardiace apariția potențialului de acțiune este legată de modificarea fluxurilor ionice de potasiu, sodiu și calciu.

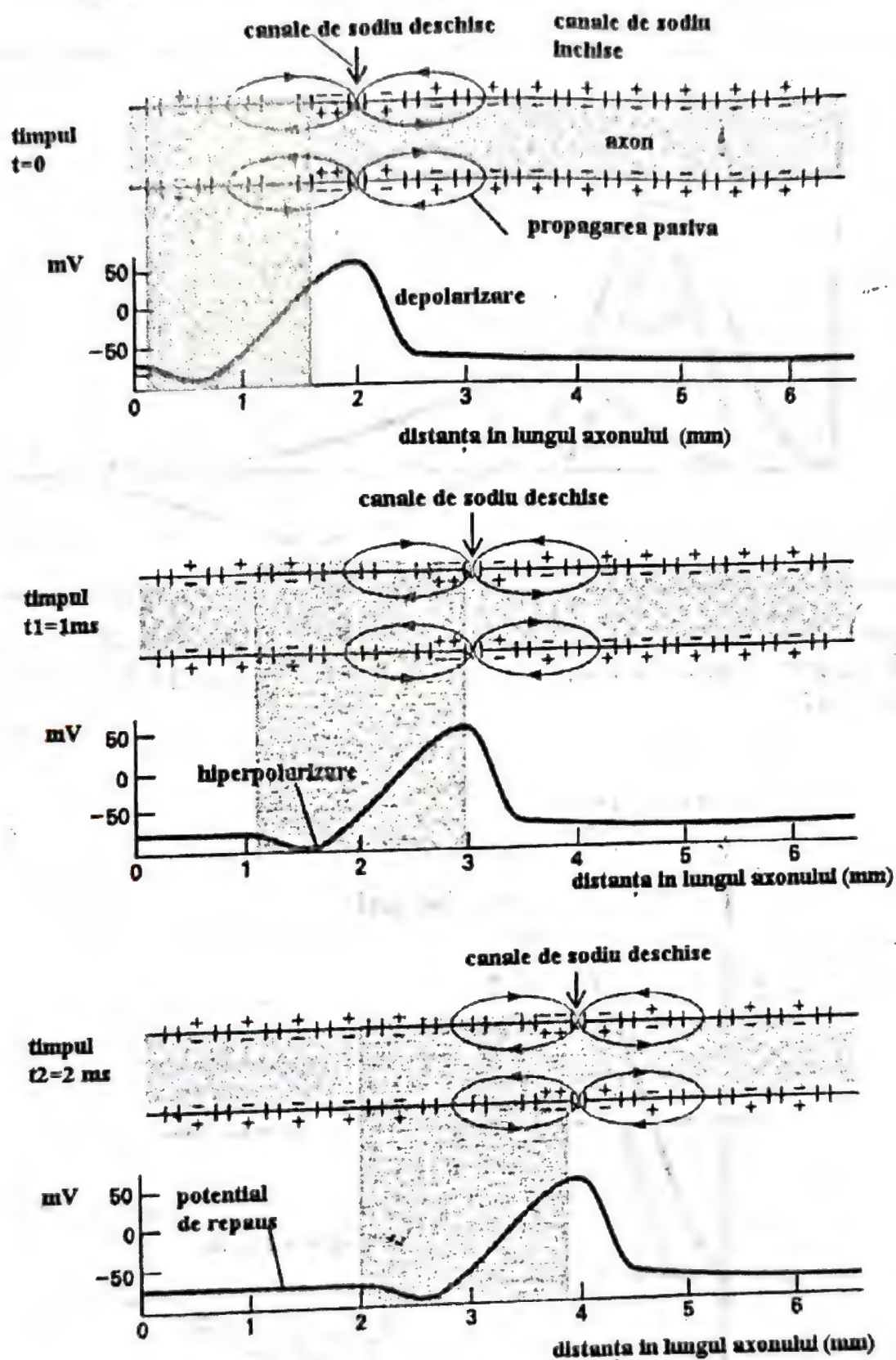


Figura 55. - Canale de sodiu dependente de voltaj ce permit propagarea unidirecțională a potențialului de acțiune (J. Darnell și col. 1990)

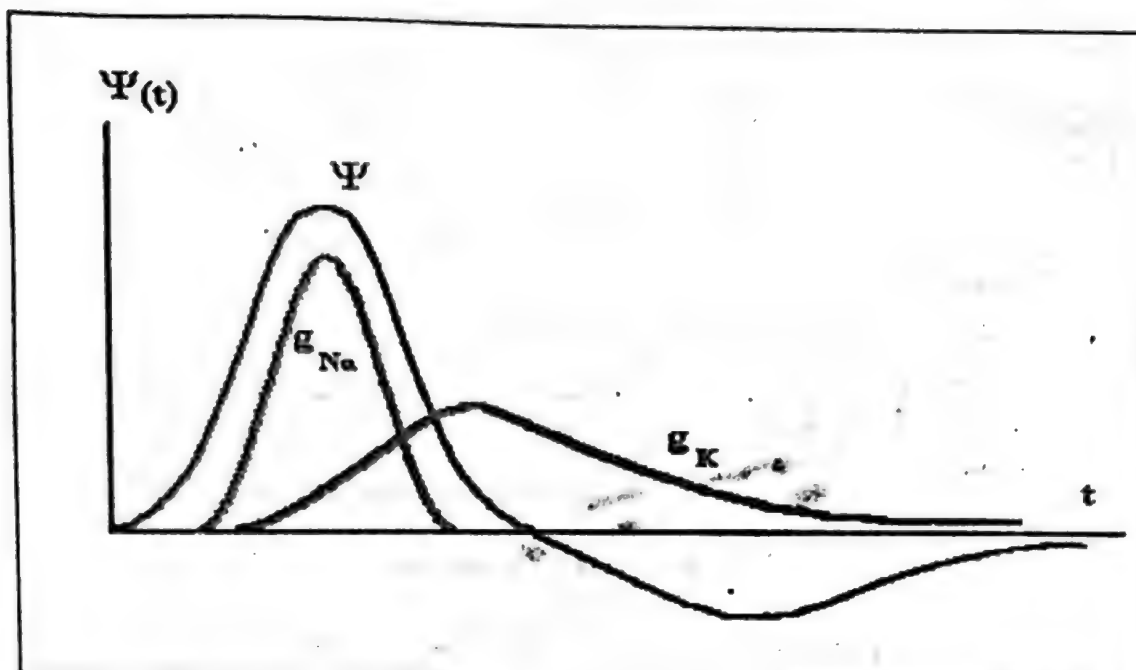


Figura 56. - Variația în timp a conductanței membranare pentru ionii de sodiu și potasiu precum și a potențialului de membrană (după F. Greym și J. Perrin 1975)

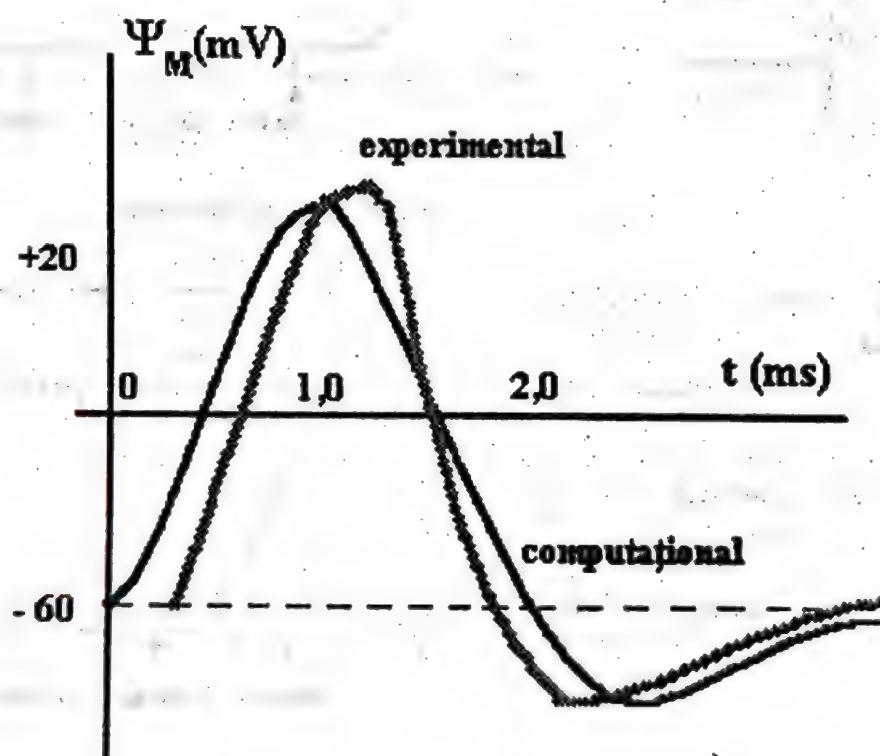


Figura 57. - Variația temporară a potențialului de membrană (după F. Greym și J. Perrin 1975)

Creșterea permeabilității membranei pentru sodiu respectiv deschiderea '*canalului rapid de sodiu*', determină un influx de ioni de sodiu în celulă, ceea ce înseamnă o depolarizare electrică a membranei și o creștere rapidă a curentului ionic prin membrană - porțiunea AB - (Figura 58). Acest canal poate fi inhibat de tetrodotoxină (TTX).

Potențialul de repaus are valoarea de -70 sau -90 mV, iar ca urmare a acestei depolarizări rapide, se poate ajunge la valoarea zero sau chiar la valori pozitive.

Ulterior, creșterea în continuare a permeabilității membranare atât pentru sodiu cât și pentru calciu este consecința activării așa numitului '*canal calciu-sodic lent*'.

Faptul că influxul de sodiu continuă și este suplimentat de influxul de calciu (gradientul electrochimic având același sens pentru ambele tipuri de ioni), se concretizează în existența unui '*platou*' al intensității curentului transmembranar (porțiunea BC).

Depolarizarea fibrei cardiace este determinată în acest caz de intrarea în joc a canalelor ionice rapide de Na - voltaj dependente, și pe de altă parte a canalelor lente de Na - Ca.

Creșterea concentrației calciului în citoplasmă este dată și de eliberarea sa din rezervele intracelulare aflate la nivelul

reticulului sarcoplasmic (RS). Acesta reprezintă semnalul pentru declanșarea contracției musculare (sistola mecanică), pe toată durata platoului.

Intrarea în acțiune a pompelor ionice cauzează diminuarea curentului ionic de intrare în celulă, simultan cu cea de-a treia modificare de permeabilitate membranară: deschiderea retardă a unor canale de potasiu, adică generarea unui eflux de potasiu către exteriorul celulei.

Aceasta se traduce printr-o diminuare a curentului total (porțiunea CD) și o repolarizare electrică rapidă a membranei și printr-o relaxarea fibrei musculare cardiace.

Dacă variațiile de potențial electric a membranei celulei musculare se pot măsura direct prin tehnicile bazate pe electrozi intracelulari (clamp voltage, etc.), ceea ce se captează cu ajutorul microelectrozilor plasați la suprafața membranei este rezultatul potențialelor de membrană generate în diferite etape ale contracției musculaturii cardiace, propagate la nivel cutanat. Un traseu electrocardiografic prezintă unde bipolare și se caracterizează prin următoarele componente numite unde (Figura 59):

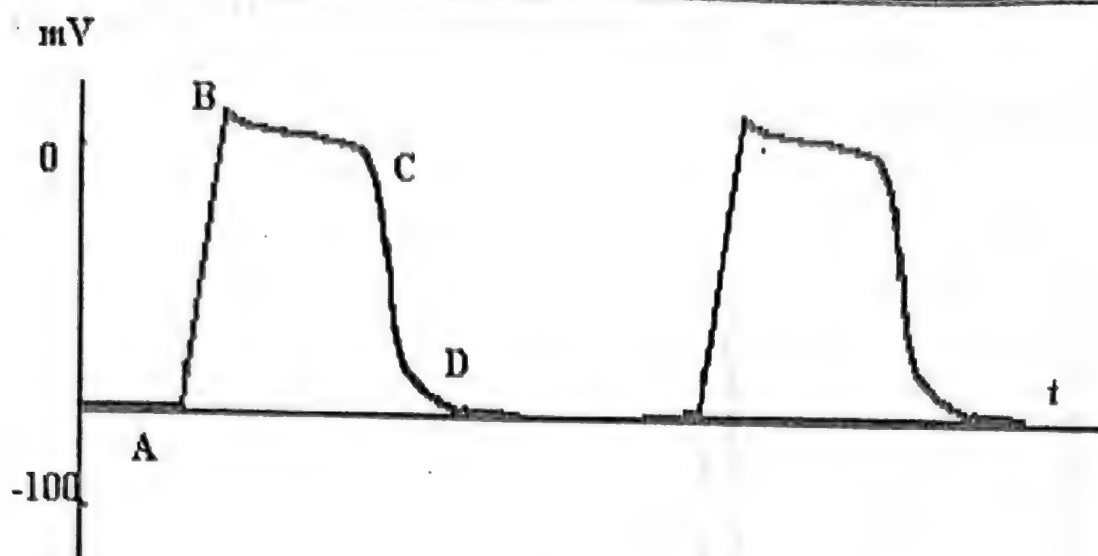


Figura 58. - Variația potențialului de membrană în celula musculară cardiacă (după F. Gremy și J. Perrin 1975).

- - unda P - reprezintă o depolarizare de mică amplitudine ce precede complexul QRS și are o semnificație similară (activarea miocardului atrial);
- - complexul QRS – de depolarizare ventriculară;
- - unda negativă Q - este o hiperpolarizare inițială de foarte mică amplitudine uneori imperceptibilă;
- - unda pozitivă R - de depolarizare rapidă și amplă care, în unele cazuri poate fi urmată de o a doua depolarizare la fel de rapidă dar mai puțin amplă, notată R' ;
- unda negativă S- de mică amplitudine, urmată, în unele cazuri de o a doua undă, S' ;
- - unda T – corespunde fazei de repolarizare ventriculară și relaxării musculaturii ventriculare și apare la întreaga masă

ventriculară, are o amplitudine de $0,2 - 0,3 \text{ mV}$ și o durată între $0,35 - 0,30 \text{ sec}$.

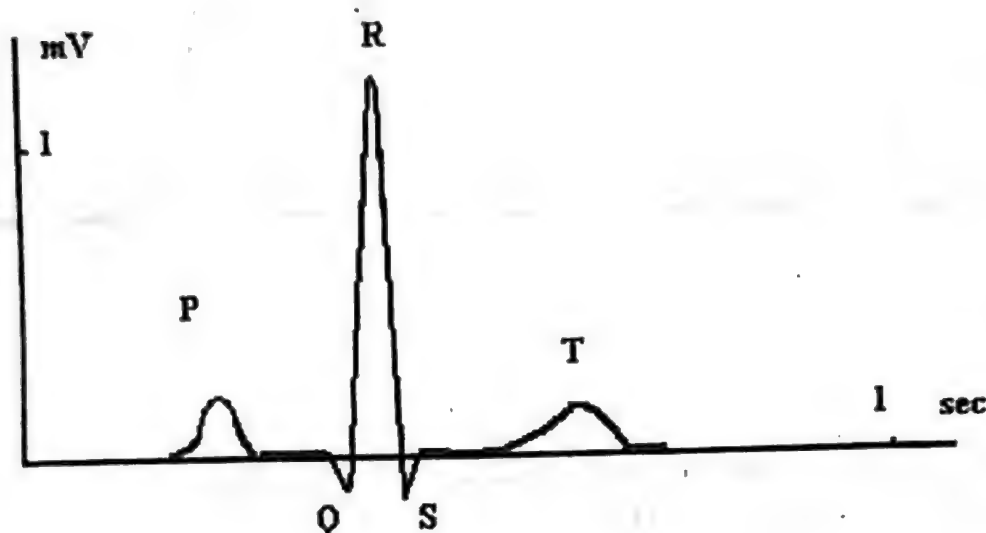


Figura 59. - Variația diferenței de potențial electric dintre doi electrozi plasați pe țesutul cutanat

Modelul vectorial de activare a componentelor electrocardiografeei dacă se consideră inima ca pe un dipol electric ce variază în timp.

Dintre studiile publicate de noi asupra potențialelor de acțiune de la nivelul celulei musculaturii striate menționăm articolele publicate în reviste ca J. Muscle Res. & Cell Motility (M. Isac și col. 1987) și Pflügers Arch. (M. Isac și col. 1988).

Tabelul 9. Componentele semnalului electrocardiografic

(după F. Gremy și J. Perrin, 1975)

Miocard Auricular	Miocard Ventricular	Electrocardiograma
1 repaus	Repaus	potențial de repaus (linia de zero)
2 în curs de depolarizare	Repaus	unda P (complex rapid)
3 excitat	Repaus	linia de zero (izoelectrică)
4 în curs de repolarizare	în curs de excitare (depolarizare)	QRS (complex rapid ventricular)
5 repaus	Excitat	linia de zero (izoelectrică)
6 repaus	în curs de repolarizare	unda T

CAPITOLUL 12

Elemente biofizice de interacțiune și comunicare celulară

12.1. Semnalizarea intercelulară: hormoni și proteine receptoare

În organismele multicelulare, există o rețea de comunicare intercelulară, complexă, care coordonează creșterea, diferențierea și metabolismul diverselor țesuturi și organe. Între grupe mici de celule comunicarea se poate realiza prin contact direct între celule (la nivelul joncțiunilor celulare). În cazul în care celulele trebuie să comunice între ele la distanțe mai mari decât pot asigura contactele directe intercelulare, atunci intervin unii produși extracelulari care acționează ca semnale intercelulare (Figurile 60, 61, 62).

Astfel, celulele semnalizatoare sintetizează și eliberează substanțe specifice - molecule semnal - sau mesageri chimici, care se deplasează spre alte celule țintă, prevăzute cu receptori specifici, în care induc un răspuns specific.

Unele molecule semnal induc modificări în activitatea uneia sau mai multor enzime prezente întotdeauna în celulele

țintă, răspunsul survenind la un interval variabil de timp (minute sau secunde).

La animale, majoritatea acestor molecule semnal sunt solubile în apă și se leagă la receptori de pe membrana celulară (Figura 63).

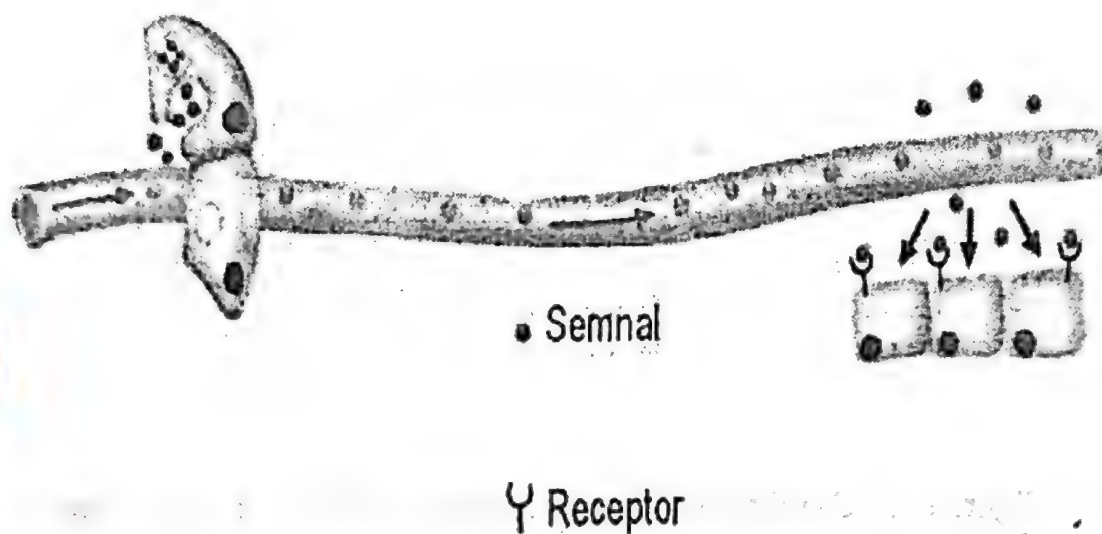


Figura 60.- Secreția de mesager chimic a unei glande endocrine (stânga) se transmite prin vasele de sânge către celulele țintă aflate la distanță (dreapta) (J. Darnell și col. 1990)

Alte molecule semnal alterează mecanismul exprimării genetice (Figura 64), acestea sunt puțin hidrosolubile, fiind mai ales liposolubile, induc răspunsuri mai târzii în celulele țintă. Cei mai reprezentativi, sunt hormonii steroizi care se leagă la receptori intracelulari, controlând anumite regiuni ale moleculelor de acid dezoxiribonucleic.

O proteină receptoare de la suprafața membranei celulei țintă sau din citoplasmă sau din nucleul acestei celule, prezintă un situs de legare cu mare afinitate pentru o anume substanță semnal: hormon sau neurotransmițător. Moleculele semnal sunt în postura de liganzi.

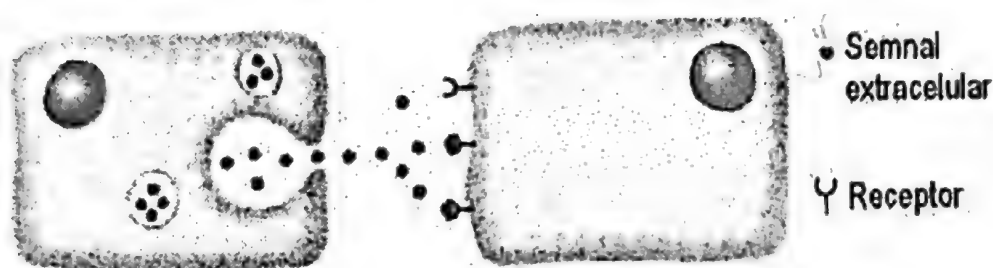


Figura 61. - Cazul semnalizării celulare la distanță mică (J. Darnell și col. 1990).

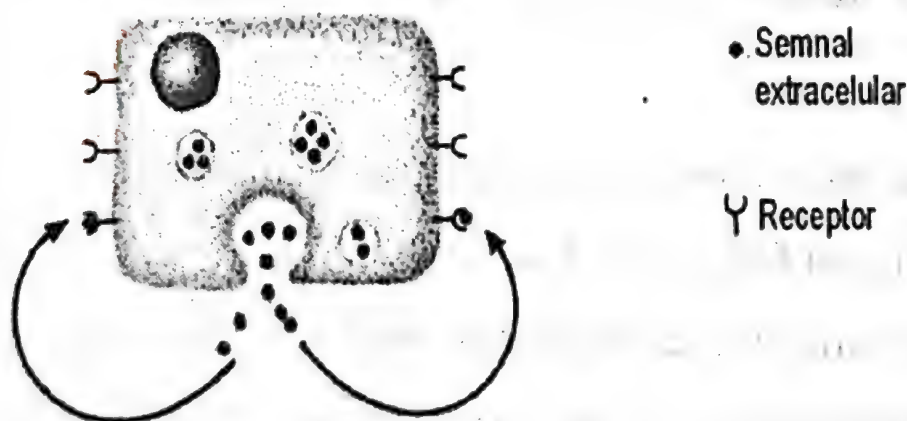


Figura 62. - Semnalizarea celulară poate avea ca țintă chiar celula care secretă molecula semnal (J. Darnell și col., 1990)

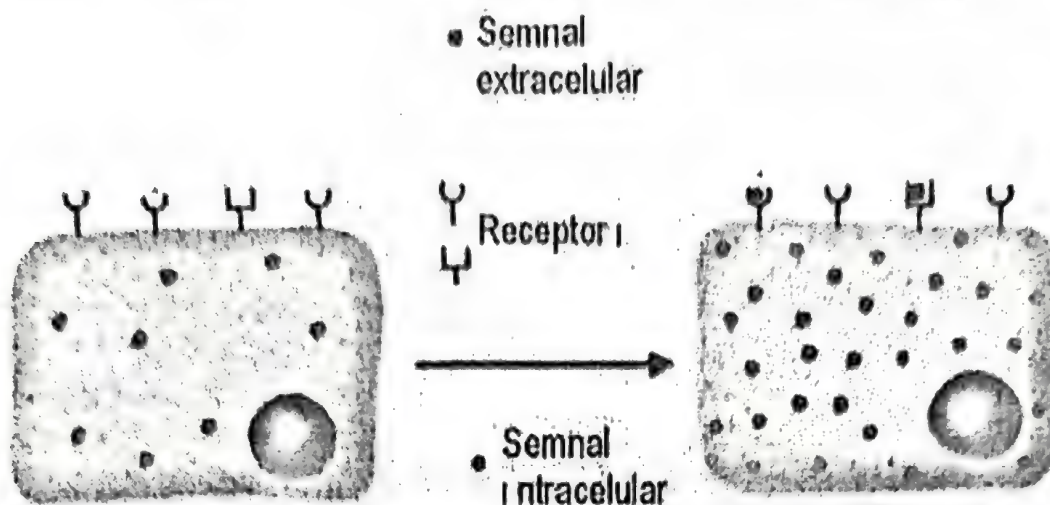


Figura 63. - Receptori aflați la suprafața membranei celulare. În lipsa mesagerului primar, în citoplasmă există un nivel scăzut de mesageri secundari (stânga), dar după cuplarea mesagerului primar cu receptorul, concentrația intracelulară de mesager secundar crește sensibil (J. Darnell și col. 1990)

Cuplarea ligandului la proteina receptoare se poate realiza prin forțe de interacțiune slabe, *de natură electrostatică (forțe van der Waals), forțe ionice și legături hidrofobe*, care determină modificări ale momentului dipolar electric al receptorului și declanșează o serie de reacții care modifică funcțiile celulei.

Printre moleculele semnal care se cuplează la receptori de pe suprafața membranei celulare se pot exemplifica : hormonii peptidici, prostaglandinele, aminoacizii, epinefrinele și compuși înrudiți, care declanșează creșterea sau scăderea concentrației citoplasmatică de mesageri secundari (cAMP, Ca^{2+} , 1,2-diacilglicerol).

În cazul mesagerilor primari din categoria hormonilor se disting trei grupe de molecule funcționale :

- Molecule lipofile care pot trece prin membrana celulară și se cuplează la receptorii din citoplasmă sau nucleu;
- Molecule lipofile care se cuplează la receptorii de suprafață ai plasmalemei;
- Molecule hidrofile care se cuplează la proteinele receptor de la suprafața membranei citoplasmatică (plasmalema);

Din prima grupă, cei mai reprezentativi sunt steroizii, tiroxina și acidul retinoic. Hormonii steroizi, de exemplu, interacționează cu receptori citoplasmatici sau nucleari formând complexe moleculare ce se acumulează în nucleu, unde se leagă la secvențe specifice reglatoare din molecula de acid dezoxiribonucleic crescând sau diminuând viteza de transcripție a genelor corespunzătoare (Figura 64).

Grupa a doua este reprezentată de prostaglandinele care acționează modulând răspunsul altor hormoni, implicați, spre exemplu în, inițierea contracției musculaturii netede.

În cea de a treia grupă sunt incluse polipeptidele mari ca insulina (Figura 65) și hormonii de creștere sau compuși mici, încărcăți electric cum sunt epinefrinele.

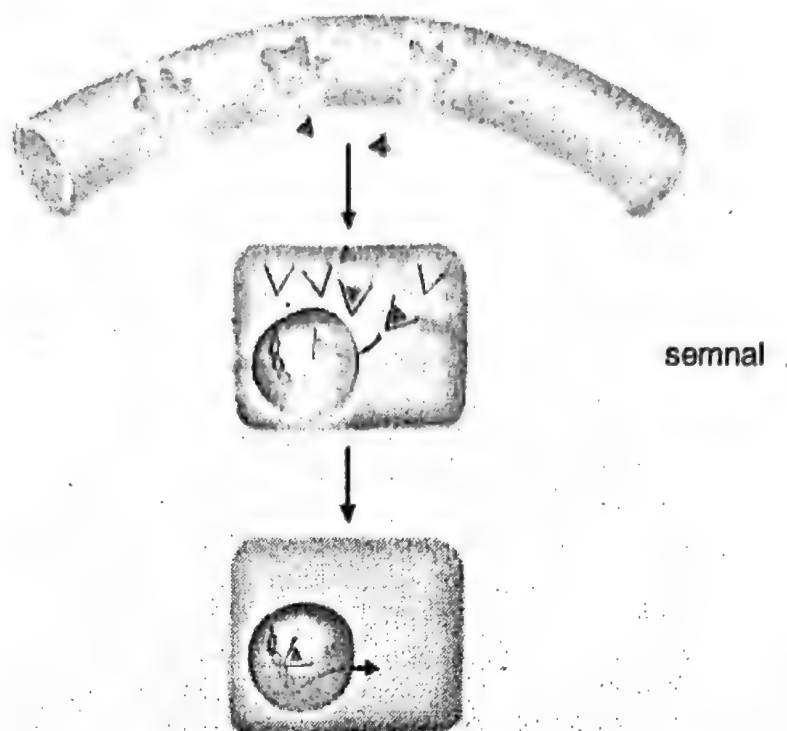


Figura 64. - Cuplarea mesagerilor liposolubili - steroizi, tiroxină, acid retinoic - (triunghiuri) la receptori citosolici sau nucleari determină modificări la nivelul acizilor nucleici (J. Darnell și col. 1990)

Unii mesageri chimici care se cuplează la proteinele receptoare de pe suprafața plasmalemei determină activarea unei enzime (Figurile 66 și 67) care generează o creștere a concentrației intracelulare a unui alt mesager - mesager secundar - implicat la rândul său, în modificarea activității altei enzime sau proteine neenzimatice din celulă.

Exemple de mesageri secundari sunt: AMP-ul ciclic (cAMP), GMP-ul ciclic (c-GMP), diacilglicerolul, ionii de calciu, inositolul, ș.a.

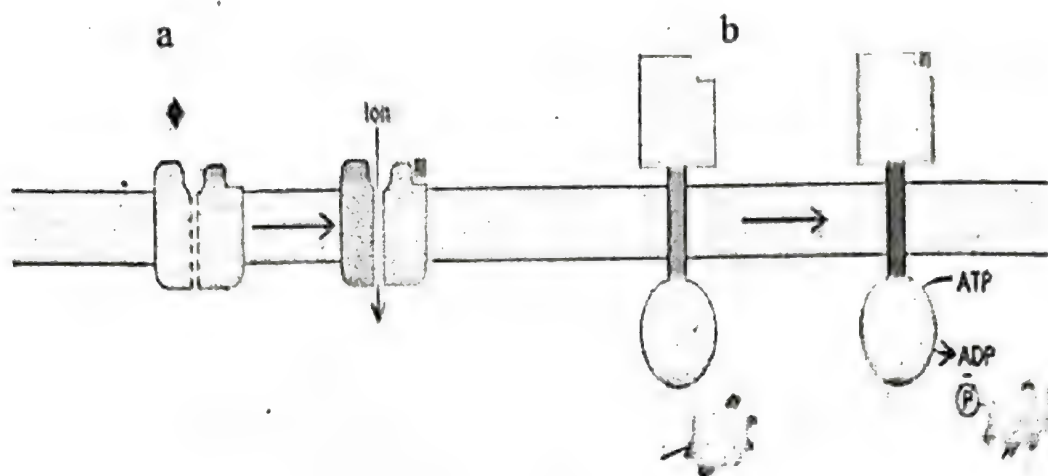


Figura 65. a - Acetilcolina eliberată de celula nervoasă controlează canalul cationic de pe suprafața membranei celulei musculare (jonțiunea neuromusculară); b - Insulina controlează proteinkinaza care controlează fosforilarea unui substrat proteic (J. Darnell și col. 1990)

Un tip de ligand deosebit de important pentru transportul prin membrană se referă la acele substanțe, molecule sau ioni, capabile să activeze canalele ionice - agregate proteice membranare care permit trecerea fluxurilor de ioni mici prin biomembrane (Figura 65). În acest caz situsul de legare a mesagerului este situat pe una din subunitățile constitutive ale canalului ionic.

Molecule analoage structural hormonilor naturali pot fi recunoscute de receptorii respectivi determinând două situații:

- declanșarea răspunsului specific, normal - agoniști;

- cuplarea cu proteinele receptoare fără declanșarea răspunsului așteptat - antagoniști.

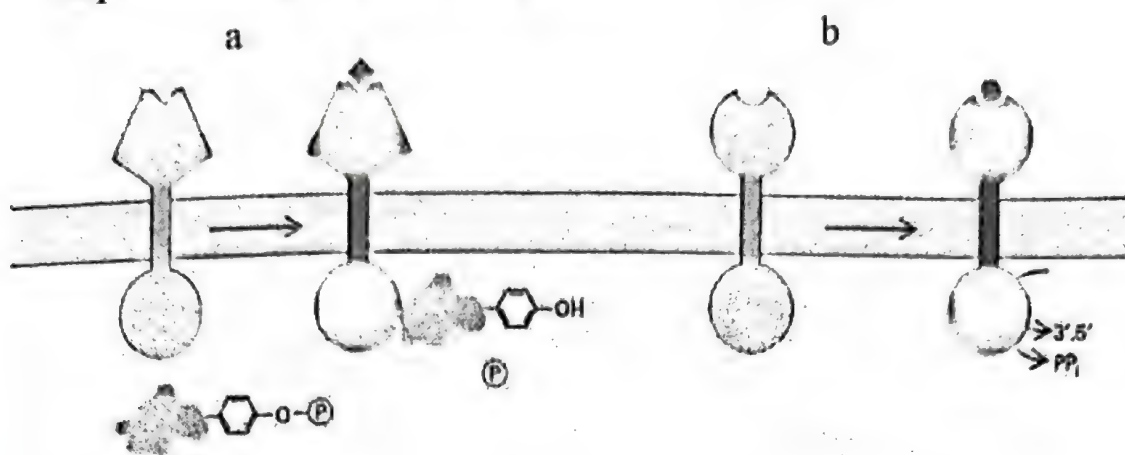


Figura 66. a - Tirozinfosfataza proteică controlată de ligand; b - guanilat ciclază controlată de ligand (J. Darnell și col.1990)

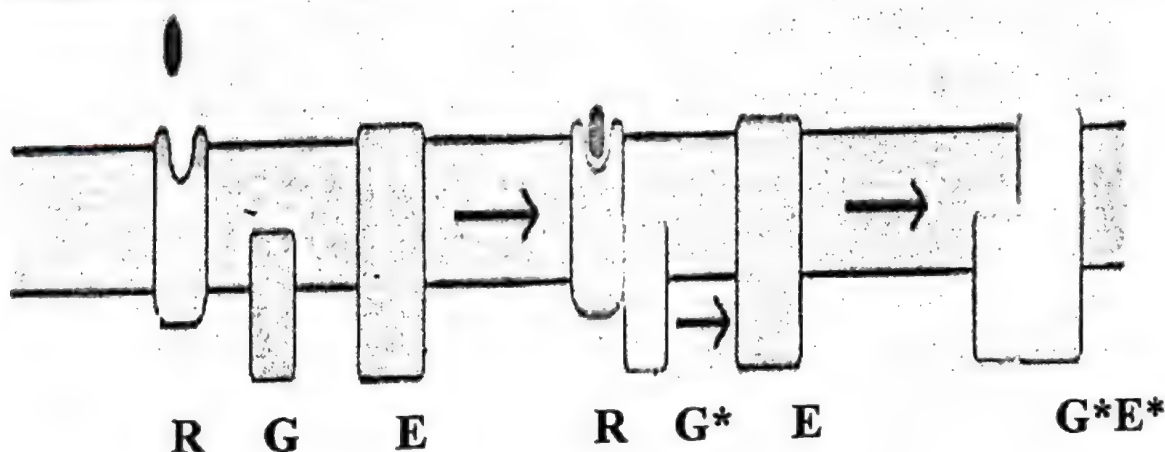


Figura 67. - Activarea controlată de ligand a proteinei G traductoare care activează o enzimă ce declanșează generarea unui mesager secundar (R - receptor, G - proteina G - inactivă, G* - proteina G activată, E - enzima inactivă, E* - enzima activată) (J. Darnell și col. 1990)

Antagoniștii intră în competiție cu hormonii naturali sau agoniștii, limitând posibilitatea de acțiune a acestora - blocându-le activitatea fiziologică.

12.1.1. Ionii de calciu - mesageri secundari

Mai mulți hormoni sunt capabili, ca prin cuplarea la receptorii membranari de la nivelul plasmalemei, să declanșeze o creștere a concentrației de calciu din citoplasmă fără contribuția calciului extracelular, ci doar pe baza golirii depozitelor intracelulare atașate reticulului endoplasmic. Mecanismul propus și susținut de dovezi experimentale este redat în schema de mai jos (Figura 68).

La cuplarea ligandului cu receptorul se activează *proteina G* care determină transformarea fosfatidil inositolului în diacilglicerol și inositoltrifosfat (transformare în care este implicată și fosfolipaza C).

Diacilglicerolul activează proteinkinaza C iar apoi aceasta determină fosforilarea și activarea unor proteine capabile să declanșeze reacții biochimice în celulă sub forma răspunsului celular specific.

Inositoltrifosfatul (IP_3) determină deschiderea unor canale ionice de calciu din rezervele citoplasmatică atașate reticulului endoplasmic. Ionii de calciu eliberați reprezintă un mesager secundar, creșterea nivelului calciului citoplasmatic

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARĂ

declanșând, de exemplu un alt răspuns celular cum ar fi contracția musculară (M. Isac și col. 1987).

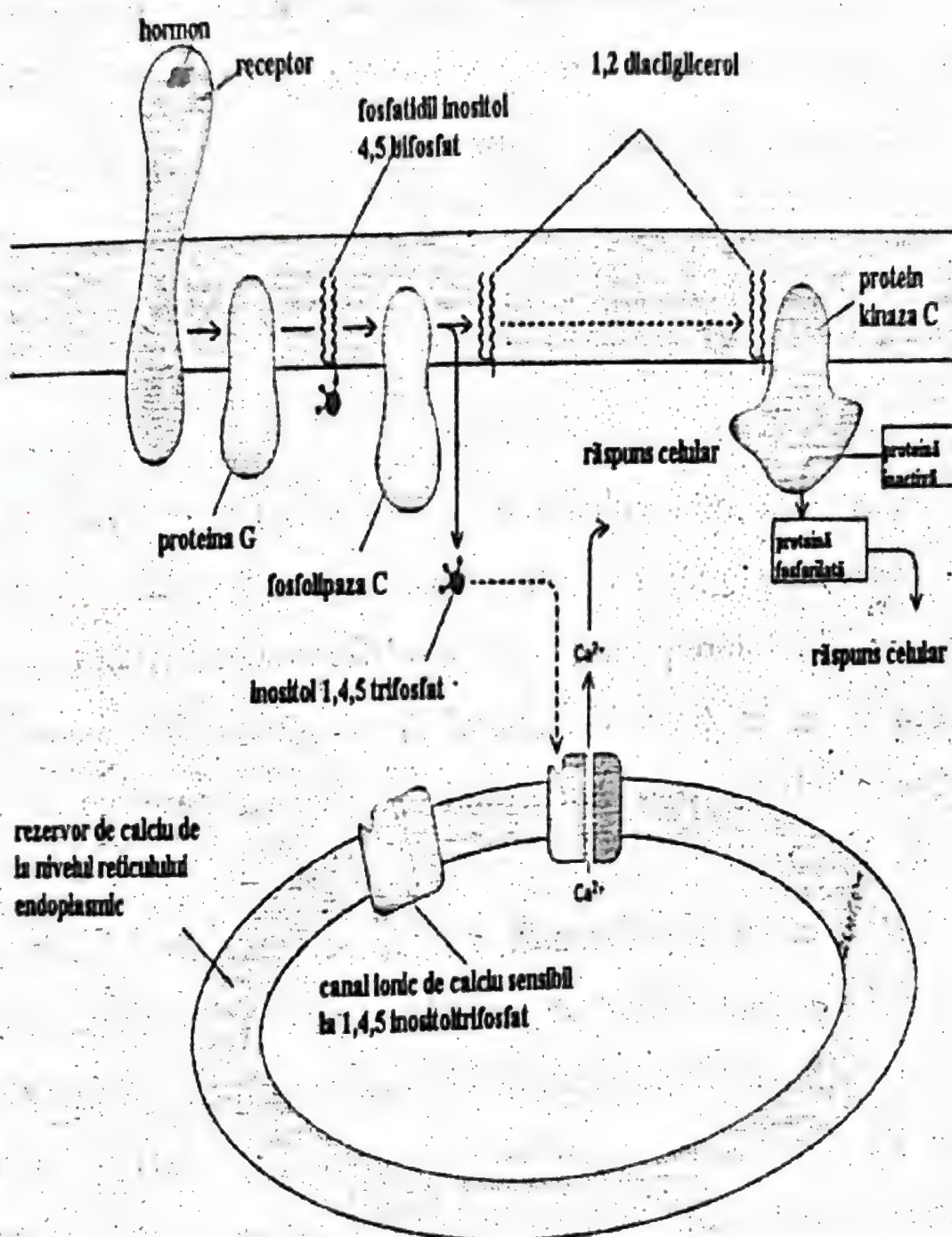


Figura 68. - Rolul calciului de mesager secundar (explicația în text) (J. Danell și col. 1990)

12.1.2. Dinamica receptorilor

Majoritatea receptorilor sunt alcătuiți din mai multe subunități proteice cu o mare mobilitate în membrană.

Neurotransmițătorii mediază chimic transmisia impulsului nervos la nivelul sinapselor neuronale corespunzătoare (sinapse chimice) cuplându-se la situsurile de legare ale unor canale ionice sau cuplându-se la receptori membranari, care nu sunt canale ionice.

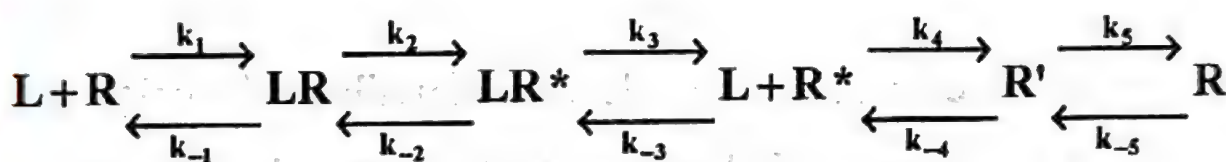
Cuplarea moleculelor de mesageri, precum hormonii sau neurotransmițătorii, la receptori specializați din membranele celulare presupune o modificare conformațională a acestora care, în lipsa mesagerului, se găsesc dispersate în membrană sub formă de subunități proteice cu mare mobilitate de mișcare.

Receptori membranari cuplați cu molecule mesager prezintă un *moment dipolar electric*, modificat față de cel al receptorului liber. În consecință, se modifică și *câmpul electric radiat* de dipolul macromolecular rezultat și deci și starea electrică a celorlalte componente membranare cu momente dipolare electrice se modifică. În aceste circumstanțe se produce și activarea unor enzime (molecule proteice dipolar-electrice)

care preiau mesajul de la receptori membranari și declanșează anumite reacții biochimice în celulă, ajungându-se la finalitatea comunicării intercelulare pe bază de molecule mesager.

12.1.3. Cinetica interacțiunii ligand - receptor

Cinetica interacțiunii ligand receptor poate fi descrisă prin schema următoare:



unde: L și R sunt ligandul și receptorul - în starea inactivă, LR și LR* sunt complexe receptor-ligand în stare neactivată și respectiv activată, R' este receptorul în stare inactivă posibil regenerativă.

Constanta de echilibru a reacției de formare a complexului ligand-receptor poate fi scrisă ca:

$$K_D = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad (105)$$

unde: parantezele pătrate se referă la concentrațiile respective, de ligand, receptor și complex ligand - receptor. Ea măsoară afinitatea receptorului pentru ligand și cu ajutorul ei reacția de cupare a ligandului cu receptorul poate fi adusă la binecunoscuta formă a relației Michaelis - Menten:

$$\frac{[LR]}{R_{\text{tot}}} = \frac{1}{1 + k_D / [L]} \quad (106)$$

unde: R_T este numărul total de receptori liberi și cuplați cu ligandul (J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore, 1990). Pentru același ligand diferite tipuri de celule țintă pot avea diferite tipuri de proteine receptoare și, pe de altă parte, un anumit tip de celulă poate avea receptori diferiți pentru același ligand. Dar același tip de receptor poate fi prezent în mai multe tipuri de celule, astfel că același ligand poate induce diferite răspunsuri.

De exemplu, acetilcolina poate fi receptată de proteine receptor din mai multe tipuri de celule (musculare striate și cardiace și unele celule pancreatice). Eliberarea acestui neurotransmițător din celulele neuronale adiacente celulelor musculaturii striate determină contracția, iar în celulele cardiace încetinesc viteza de contracție. Dar sunt situații când ,

în unele tipuri de celule, același răspuns celular poate fi indus de diferite complexe receptor-ligand.

Delimitarea între hormoni și neurotransmițători este destul de dificil de făcut, de regulă hormonii acționând la distanțe mai mici decât neurotransmițătorii, aceștia din urmă fiind, pe de altă parte eliberați din celulele nervoase sub formă de vezicule în spațiul postsinaptic (la nivelul sinapselor) iar nu de glandele endocrine. Ligandul nu este metabolizat de în produse utile celulei, nu este un intermediar în în vreuna din activitățile celulare și nici nu are proprietăți enzimaticе.

Moleculele proteice receptoare adesea, degradează sau modifică moleculele semnal. În acest fel, modificându-și sau încheindu-și răspunsul specific față de ligand, după cum și modificările structurale sau reducerea situsurilor receptoare stau la baza unor importante mecanisme biologice sau patologice, incomplet elucidate, (ex: activitatea spontană de tip pacemaker, electrogeneza din sindromul miastenic sau miotonic, traseele de tip neurogen sau miogen, etc. (F. Topoliceanu și I. Haulică și col., 1984; I. Haulică și col., 1989).

12.2. Interacțiuni antigen - anticorp

Una din funcțiile sângelui este cea legată de participarea sa la reacțiile imunitare ale organismului, funcție care se exercită în principal prin intermediul unora din tipurile de celule albe ale sângelui și anume **limfocitele de tip B și T**, care participă diferențiat la realizarea, respectiv a imunității umorale și a celei celulare.

Generarea răspunsului imun se realizează în raport cu diferiți agenți străini, pătrunși în interiorul organismului, fie prin distrugerea lor de către limfocitele T activate, în cadrul imunității mediate celular, fie prin geneza unor molecule proteice (globuline), denumite anticorpi, în cadrul imunității umorale, prin interacțiuni de tip antigen - anticorp.

Reacțiile antigen-anticorp constituie fenomene esențiale având un rol bine precizat de distrugere, neutralizare sau de eliminare (de către anticorpi) a toxinelor sau a agenților patogeni (antigenii). Fenomenele fizico - chimice sunt cele care oferă posibilitatea înțelegerii parțiale, a înaltei specificități a acestor interacțiuni, problema rămânând deschisă cercetărilor în domeniu.

12.2.1. Antigenii

Dacă *anticorp*ii sunt în exclusivitate *molecule proteice*, așa cum se va arăta mai jos, *antigenii* pot fi *polipeptide*, *lipopolizaharide*, *acizi nucleici* ș.a, care în urma pătrunderii în organism pot declanșa un răspuns imun, adică induc elaborarea de anticorpi (fenomenul de imunogenitate) care reacționează specific *in vivo* și *in vitro*, sub forma complexului antigen-anticorp.

Structura antigenilor conține o parte extinsă, cu rol de purtător (un suport coloidal constituit în principal dintr-o proteină cu masă moleculară mare) și o grupare determinantă (determinant antigenic sau situs antigenic sau *epitop*), care este un fragment cu masă moleculară mică aparținând, de asemenea moleculei de antigen.

O moleculă de antigen poate avea unul sau mai multi epitopi, numiți și situsuri antigenice sau haptene.

Dacă un antigen are o singură grupare determinantă (haptenă), atunci este denumit antigen monovalent și poate să reacționeze cu un singur anticorp. Dacă antigenul are mai multe haptene atunci se numește polivalent și poate să se lege

simultan de mai mulți anticorpi. Valența antigenilor poate ajunge la valoarea de 500.

12.2.2. Anticorprii

Anticorprii sunt proteine din clasa *imunoglobulinelor* cu o greutate moleculară mare, de la 100.000 Da la 1.000.000 Da, elaborate în principal de limfocitele de tip B, unele limfocite de tip T, putând fi implicate în formarea anticorpilor și reglarea complexă a întregului mecanism imun, inclusiv cel natural.

Imunoglobulinele (Ig) se împart, după masa lor moleculară, după compoziția chimică și după constanta de sedimentare, în clase denumite: **Ig G, Ig A, Ig M, Ig D, Ig E**, etc. Ele reprezintă structuri proteice care includ un situs de combinare (analog situsului antigenic) numit și *paratop* la nivelul căruia, se realizează legătura cu antigenul. Aceasta are loc la nivelul jumătății terminale a legăturii azotice compusă din lanțurile H și L, jumătatea terminală C formată din lanțuri grele individuale determinând clasa anticorpilor.

Schema unei imunoglobuline prezintă "**lanțuri grele**" de atomi și "**lanțuri ușoare**", legate prin punți disulfurice (Figura 69). Structurile primare și secundare sunt cunoscute pentru mai multe imunoglobuline.

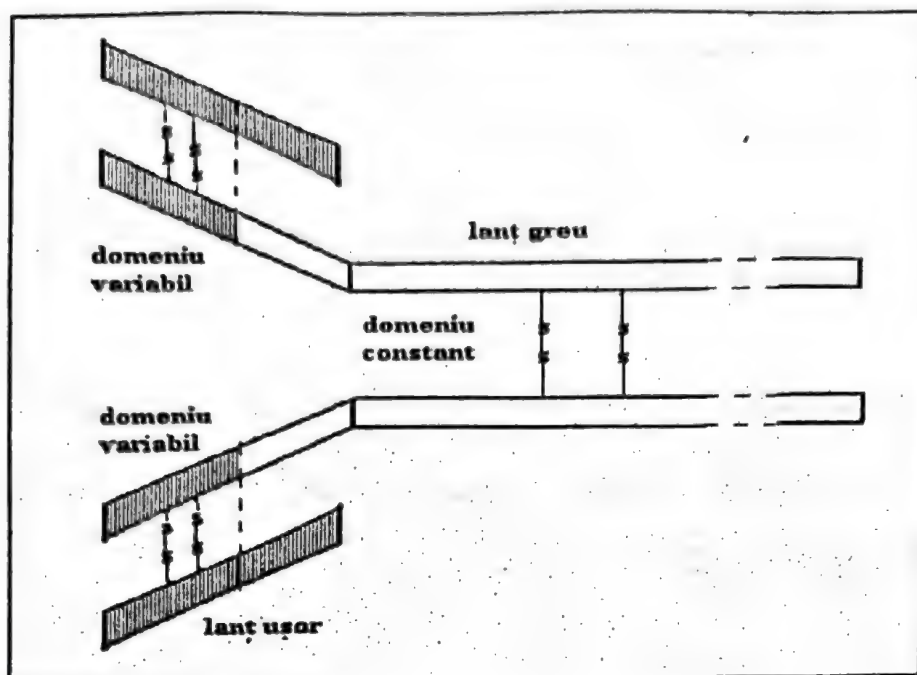


Figura 69. - Reprezentare schematică a unui anticorp bivalent. Lanțurile paralele din structura primară sunt unite prin legături disulfurice (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975).

La categoriile **IgG** și **IgA** întâlnim asociații de două "lanțuri grele" și "lanțuri ușoare"; imunoglobulinele **Ig M** sunt compuse din ansambluri de "lanțuri grele" și "lanțuri ușoare" în număr egal dar numărul lanțurilor este un multiplu al celui care se găsește în alte imunoglobuline.

Cel mai adesea imunoglobulinele sunt bivalente, dar pot fi și multivalente. În cazul cel mai simplu, interacțiunea elementară între o haptenă și un anticorp univalent se scrie:



unde: **A** reprezintă anticorpul, **H**-haptena iar **AH** complexul format.

Reacția este reversibilă și se caracterizează prin constantele de viteză k_1 și k_2 . Legea acțiunii maselor permite ca la echilibru formula (107) să devină:

$$\frac{[AH]}{[A][H]} = \frac{k_1}{k_2} = K \quad (108)$$

unde: **K** este constanta de echilibru, $[A]$, $[H]$ și $[AH]$ sunt respectiv concentrațiile de anticorp liber, haptena liberă și imunocomplex (complexul antigen-anticorp).

Cunoscând valoarea lui **K** este ușor de calculat variația energiei libere de reacție:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (109)$$

unde: **G** - este energia liberă a reacției, **R** - constanta universală a gazelor perfecte iar **T** - temperatura absolută. Energia de legătură antigen - anticorp rezultă din ecuația lui Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (110)$$

în care: S este entropia iar H este entalpia liberă (energia de legătură la presiune normală).

Studiile efectuate arată că variația entropiei este uimitor de mică dar aceasta se explică prin faptul că se poate măsura numai variația de entropie globală pentru două tipuri de procese care au loc (unul este cel care interesează în primul rând din punct de vedere imunologic și presupune diminuarea numărului de grade de libertate ale moleculelor legate dar există și un al doilea proces și anume procesul de îndepărtare a moleculelor de apă legate (adsorbite) care precede fixarea antigenului pe anticorp.

$$\Delta S = \Delta S_1 - \Delta S_2 \quad (111)$$

$$\Delta S_1 > 0, \Delta S_2 < 0; |\Delta S_1| \cong |\Delta S_2| \quad (112)$$

Dacă ordinul de mărime a lui ΔG este de cca. 7 kcal/mol atunci și pentru energia de legătură se obțin valori la fel de mici și cu puține diferențe de la o reacție la alta.

12.2.3. *Natura forțelor implicate în interacțiunile elementare antigen - anticorp*

Interacțiunile antigen - anticorp se derulează în două faze succesive, o fază primară (elementară) și o fază secundară.

Energia mică de legătură a reacțiilor elementare și influența pH-ului asupra cineticii reacțiilor (pH-ul optim este 7,3 - 7,5 similar cu valoarea serului sanguin), arată că forțele de legătură nu sunt covalente (la acestea energia de legătură fiind de 50÷100 kcal/mol), ci de natură electrostatică, ceea ce nu este de mirare știind că sunt implicate proteine amfolute; avem de-a face așadar cu :

- legături ionice;
- forțe electrostatice de atracție între grupuri cu sarcini electrice de semne opuse;
- forțe electrice de interacțiune dipol - dipol;
- forțe de dispersie Van der Waals - London între grupări de atomi inițial neîncărcate electric dar care se pot polariza;
- interacțiuni între grupe de atomi hidrofobe.

Structura anticorpilor și antigenilor permite o reprezentare care sugerează și faptul că, deși slabe, legăturile electrostatice se manifestă în contextul stereospecificității

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

imunocomplexului ceea ce duce la deosebita stabilitate a acestuia.

12.2.4. Reacțiile secundare

Este destul de probabil că dacă reacția antigen - anticorp s-ar limita la reacția elementară descrisă mai sus, atunci nu s-ar cunoaște încă decât puține lucruri în imunologie și chiar finalitatea acestui tip de reacție ar fi mai puțin clară căci imunocomplecșii sunt adesea solubili și greu de evidențiat microscopic (se apelează la metode radioimunochimice – RIA).

Dar cum, în majoritatea cazurilor reacția elementară este urmată rapid de reacții secundare, ce duc la transformări mult mai ușor de pus în evidență, cercetările care s-au întreprins, au avut puncte de sprijin importante în aceste reacții secundare.

În majoritatea cazurilor fenomenul secundar este atât de dominant încât servește la definirea reacției considerate. Reacțiile secundare sunt mult mai ușor de pus în evidență căci se însoțesc de precipitări, floculări, aglutinări, hemolize, etc. și acestea sunt ușor de observat macroscopic.

Nu trebuie scăpat din vedere, că numai reacția elementară este specifică (reacțiile secundare nu sunt specifice) adică reacții primare diferite pot antrena aceeași reacție secundară.

12.2.5. Cinetica formării imunocomplexului antigen-anticorp

În cazul cel mai simplu, al unui anticorp monovalent și al unei haptene libere (singurul caz real cunoscut este cel al brucelozei) ecuația diferențială care a fost propusă să descrie cinetica procesului (cinetică de ordinul doi):



corespunde, de fapt, cineticii concentrației de anticorp:

$$\frac{da(t)}{dt} = -k_1 a(t) h(t) \quad (114)$$

unde: $a(t)$ și $h(t)$ sunt concentrațiile de anticorp și respectiv de antigen la momentul de timp t iar k_1 este constanta de cuplare a celor doi reactanți.

La momentul inițial $t_0=0$ aceste concentrații au valorile a_0 și h_0 iar consumul este 1:1 (o moleculă de anticorp la o moleculă de antigen) permite scrierea relației de legătură:

$$a_0 - a(t) = h_0 - h(t) \quad (115)$$

cu ajutorul căreia se poate ajunge la o ecuație cu o singură variabilă - $a(t)$. Astfel ecuația de mai sus devine:

$$\frac{da(t)}{dt} = -k_1 [a^2(t) + (h_0 - a_0)a(t)] \quad (116)$$

Se separă variabilele pentru a integra:

$$\int \frac{da(t)}{a^2(t) + (h_0 - a_0)a(t)} = \int -k_1 dt \quad (117)$$

Folosind condițiile inițiale și în ipoteza unui exces de antigeni (caz apropiat de situațiile reale), se obține:

$$\ln \frac{a(t)h_0}{a_0[a_0(a(t) + h_0 - a_0)]} = -k_1 t(h_0 - a_0) \quad (118)$$

ceea ce reflectă o variație exponențială în timp a concentrației de anticorp.

În forma logaritmică, relația dedusă mai sus este foarte convenabilă pentru determinarea experimentală a raportului

concentrațiilor de la momentul inițial precum și a constantei de viteză a procesului (dacă se cunoaște cel puțin una din aceste concentrații inițiale).

Practic se lucrează prin marcarea cu izotopi radioactivi în cazul evaluărilor radioimunologice (RIA – radioimmunological assay), datele numerice prelucrându-se prin atât de cunoscuta metodă a celor mai mici pătrate (pentru obținerea numerică a pantei și tăieturii la ordonată a dreptei celei mai probabile).

Dacă inițial cele două concentrații de reactanți sunt egale atunci ecuația diferențială devine:

$$\frac{da(t)}{dt} = -k_1 a^2(t) \quad (119)$$

iar integrarea conduce la:

$$\frac{1}{a(t)} = \frac{1}{a_0} + k_1 t \quad (120)$$

ceea ce conduce la evaluări și mai rapide ale concentrațiilor inițiale și ale constantei vitezei de formare a

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

imunocomplexului, având în vedere că graficul este o dreaptă (Figura 70).

Reversibilitatea procesului este mult mai puțin probabilă, constanta de viteză a desfacerii imunocomplexului fiind cu multe ordine de viteză mai mică decât cea a formării complexului antigen-anticorp.

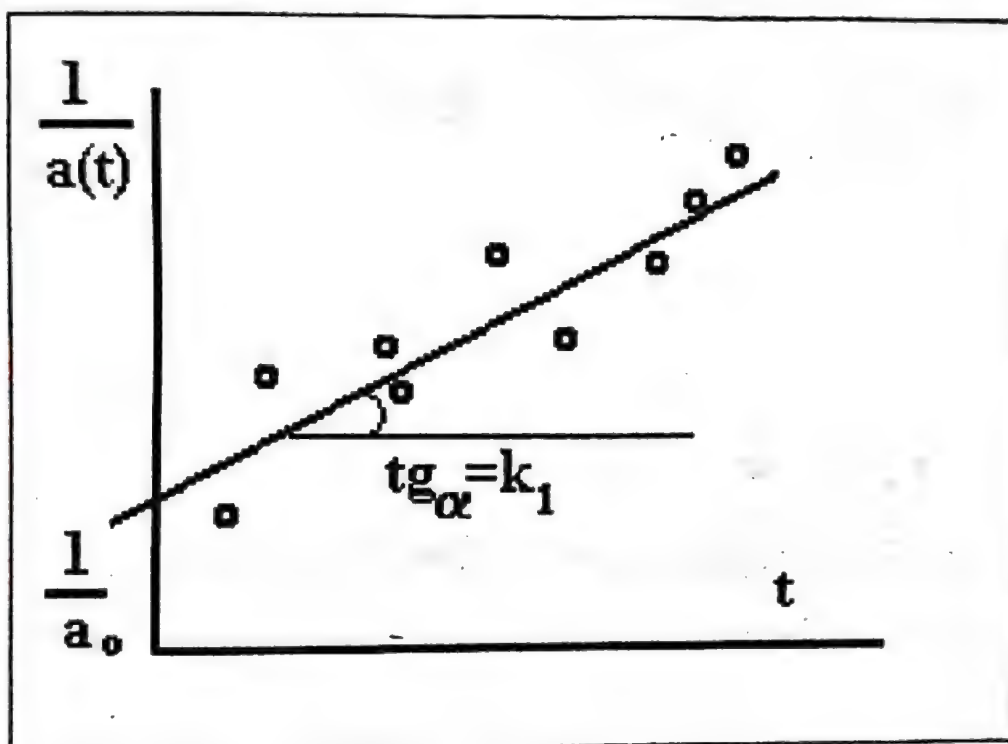


Figura 70. - Dependența liniară de timp a inversului concentrației de anticorp în cazul când concentrațiile inițiale de reactanți sunt egale

12.2.6. Cinetica desfacerii complexului imunologic

Ecuția diferențială propusă pentru descrierea acestei faze a procesului corespunde unei cinetici de ordinul întâi:

$$\frac{dx(t)}{dt} = -k_2 x(t) \quad (121)$$

unde: $x(t)$ este concentrația de imunocomplex la momentul de timp t iar x_0 este valoarea acestei concentrații la momentul inițial considerat, $t_0 \neq 0$.

Prin integrare rezultă:

$$\ln(x(t)) = -k_2 t + \ln x_0 + k_2 t_0 \quad (122)$$

sau:

$$x(t) = x_0 e^{-k_2(t-t_0)} \quad (123)$$

ceea ce grafic se reprezintă ca o simplă exponențială (Figura 71) și permite determinarea fără dificultăți a constantei de viteză k_2 .

Cunoscând cele două constante de viteză rezultă imediat constanta de echilibru a acestei interacțiuni:

$$k = \frac{k_1}{k_2} \quad (124)$$

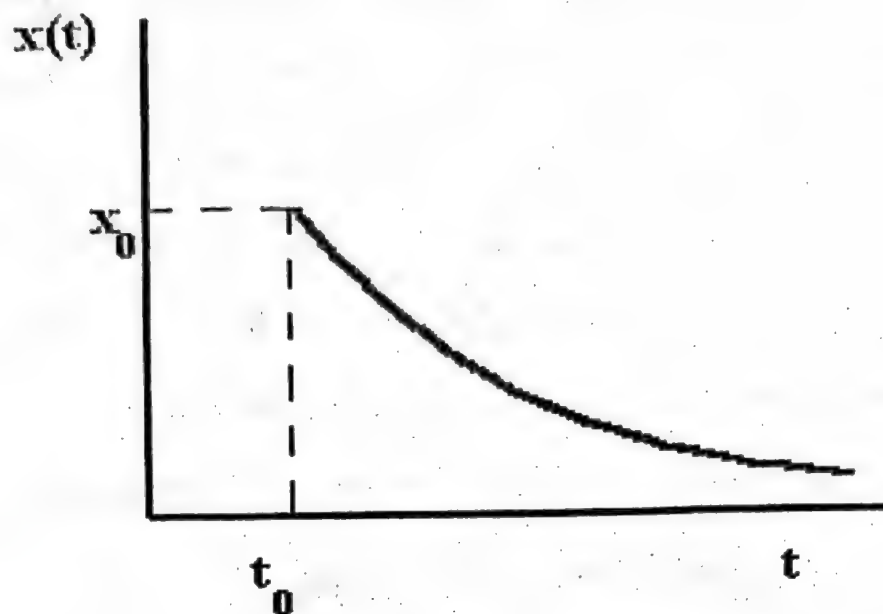


Figura 71.- Scăderea în timp a concentrației de complex antigen - anticorp

Pentru evidențierea interacțiunii antigen-anticorp se poate utiliza fenomenul de difuzie prin membrană dializantă.

12.2.7. Determinarea constantei de echilibru a procesului imunologic pe baza difuziei prin membrana dializantă

Prin cuplarea haptenelor la moleculele proteice de anticorpi, dimensiunile acestora cresc în raport cu cele ale porilor unei membrane dializante, astfel că această membrană permite realizarea echilibrului de difuzie liberă pentru moleculele mici de haptentă, dar nu și pentru imuncomplexi.

Informațiile necesare echilibrului antigen - anticorp rezultă din determinarea concentrațiilor de haptenă liberă și respectiv, cuplată cu anticorpul. În situația când avem de-a face cu un anticorp n - valent, fiecare astfel de moleculă proteică poate fixa pe cele n situsuri ale sale de legătură tot atâtea molecule de haptenă liberă. Deci utilizăm notațiile:

- na_0 - concentrația inițială de situsuri anticorpice de interacțiune cu antigenii monovalenți (haptenele);
- a_0 - concentrația inițială de anticorpi;
- $x_n(t)$ - concentrația de complex antigen-anticorp la momentul de timp t .

Constanta interacțiunii antigen - anticorp va fi dată (conform definiției generale a unei constante de echilibru a unei reacții) de:

$$k = \frac{x_n(t)}{h(t)[na_0 - x_n(t)]} \quad (125)$$

Pentru a se pune în evidență faptul că se urmărește concentrația de haptenă liberă, aceasta se re-notează cu $c = h(t)$, iar raportul dintre concentrația de imunocomplex și concentrația inițială de anticorp se notează cu r :

$$r = \frac{x_n(t)}{a_0} \quad (126)$$

Astfel se obține:

$$\frac{r}{c(t)} = k(n - r) \quad (127)$$

această relație având o formă convenabilă pentru determinările experimentale în care, prin diverse metode fizico-chimice se determină r și $c(t)$. Graficul $r/c(r)$ este, teoretic, o dreaptă (Figura 69), astfel că pentru $r/c=0$ avem $n=r$.

În practică se obține o curbă, variația pantei, k , fiind cauzată de faptul că vitezele de reacție nu sunt mereu constante inițial, când anticorpii sunt liberi viteza de legare a haptenelor este mai mare decât, atunci când formarea imunocomplexelor îngreunează contactul haptenelor libere cu ceilalți anticorpi, liberi, deci vitezele de reacție sunt mai mici.

Altfel spus, funcția de distribuție a valorilor unei „constante de asociere” antigen-anticorp, care s-ar putea defini în acest context încetează a mai avea o formă gaussiană, corespunzătoare cazului teoretic.

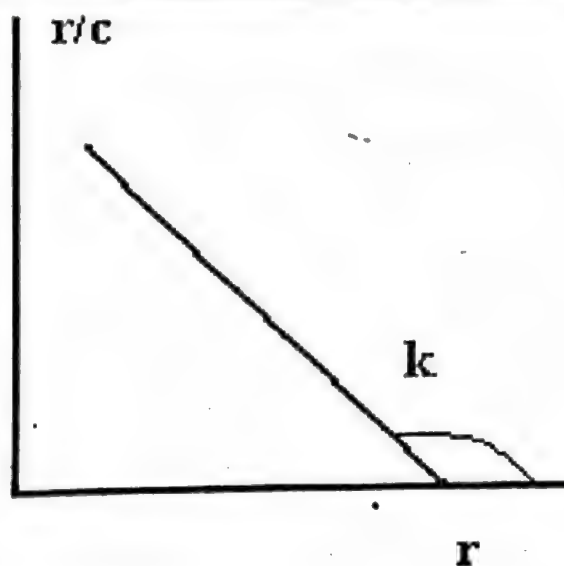


Figura 72. - Dependența lui r/c de r (r - raportul dintre concentrația de imunocomplex și concentrația inițială de anticorp și c - concentrația de antigen)

Dacă anticorpul liber sau haptenele sunt fixați pe un suport (o membrană semipermeabilă, un adsorbant, particule solide, etc.) atunci reacția se produce numai dacă există situsuri de reacție neocupate de legătura la suport. Chiar dacă în astfel de cazuri cinetica este mai heterogenă, starea de echilibru se poate descrie prin aceleași legi.

S-a prezentat aici îndeosebi, aspectele fizico-chimice și matematice fundamentale ale proceselor imunologice căci le considerăm importante pentru înțelegerea mai profundă a aspectelor medicale, atât de complexe, ale interacțiunii antigen-anticorp.

De-a lungul ultimelor decenii au fost efectuate numeroase studii experimentale referitoare la aspectele

biofizice ale imunogenezei, la premisele teoretice ale fenomenelor legate de imunogeneză, la factorii care influențează producerea anticorpilor și prezența fenomenelor de chinotactism leucocitar din cadrul imunității naturale.

Cercetările de biofizică, fiziologie, microcirculație și reologie din laboratoarele universitare ieșene, s-au înscris pe această linie cu modestele posibilități de care dispun, evidențiind experimental câteva aspecte legate de efectele toxice ale unor antigeni de tipul pesticidelor (S. Apostol, M. Isac, R. M. Isac, 1987), influența câmpurilor magnetice asupra imunogenezei (O. Ailiesei și M. Isac, 1978) și particularitățile hemoreologice, de chimotactism sau interacțiunilor citoparietale ale leucocitelor în rețeaua microvasculară (F. Topoliceanu 1991; I. Haulică și col. 1995).

CAPITOLUL 13

Elemente de biofizică eritrocitară și hemoreologie

Membrana celulei eritrocitare este una din membranele cele mai mult studiate (alături de membrana celulei nervoase), totuși detaliile de structură sunt departe de a fi pe deplin clarificate. Datele experimentale existente au permis elăborarea unui model structural și a unor modele fizice care să explice principalele caracteristici biofizice și funcții ale acestei membrane, foarte importantă în contextul funcțiilor complexe îndeplinite de sânge (Figura 81).

13.1. Modelul structural și modelul fizic al membranei eritrocitare

Ca model structural, membrana eritrocitară se încadrează în *mozaicul fluid*, particularizat pe baza existenței unor proteine membranare speciale. Astfel, pe lângă proteinele obișnuite extrinseci și intrinseci, prezente la majoritatea tipurilor de membrane citoplasmatiche, dublul strat lipidic este

străbătut de o proteină deosebită, *glicoforina*, de tip intrinsec, cu o pondere de 10% din totalul proteinelor membranare și 20% din totalul celor intrinseci ale acestei membrane.



Figura 73. - Eritrocitele au formă de disc subțiat la mijloc (ca o lentilă biconcavă – J. Darnell și col 1990)

Partea din interiorul membranei este hidrofobă, la fel ca și lanțurile de acizi grași din constituția bistratului lipidic, în timp ce capetele proteinei, aflate la fața internă și la cea externă, sunt hidrofile.

Capătul de la fața externă, care face parte din învelișul celular (structură laxă, pufoasă, cu consistență foarte mică în raport cu peretele celular de la microorganisme sau de la celulele vegetale), prezintă mai multe grupări oligozaharidice

(și mai ales resturi de acid sialic orientate paralel cu planul membranei) a căror presupusă funcție este cea de menținere a încărcării electrice negative pentru împiedecarea aglutinării eritrocitelor.

Capătul de la fața internă se cuplează cu *spectrina*, o proteină submembranară din constituția eritrocitului, a cărei funcție pare să fie în principal cea de menținere a formei de disc biconcav (formă ce asigură o suprafață optimă de difuzie a oxigenului transportat de hemoglobina din citoplasma eritrocitului). Practic această proteină, ca și actina cu structură microfilamentară fac parte dintr-o structură de rețea în care sunt angrenate și moleculele macroergice de ATP și au rol însemnat și în deformabilitatea mecanică a eritrocitului.

Proteina PB3 este numită astfel după poziția în care a apărut la separarea electroforetică (proteina benzii 3, Figura 74 și 83). Ea reprezintă circa 55% din totalul proteinelor intrinseci ale membranei și 25% din totalul proteinelor din constituția membranei. Aceasta străbate membrana de mai multe ori și este implicată în transportul anionilor și, se pare, și al apei.

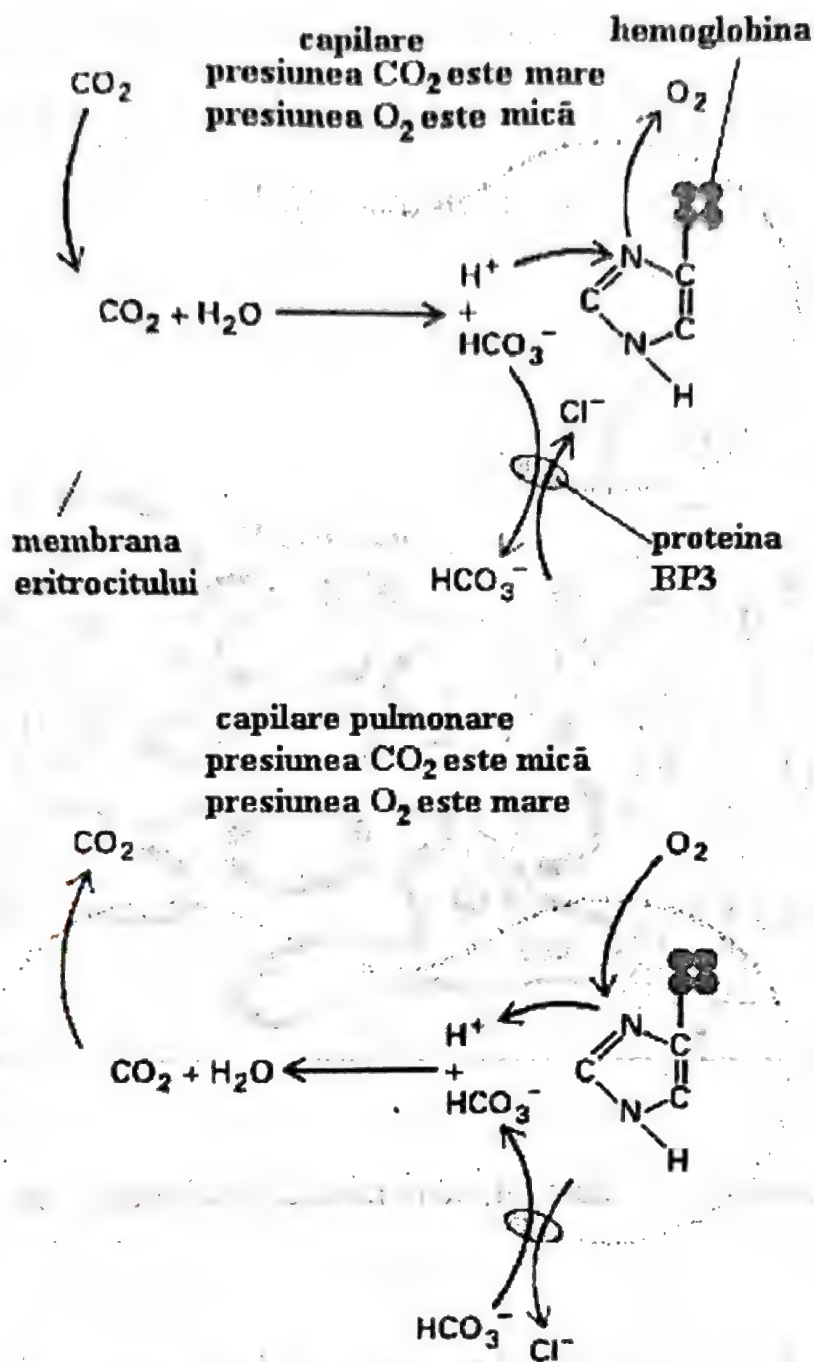


Figura 74. - Proteina BP3 este implicată în transportul prin membrană al anionilor (J. Darnell și col. 1990)

În ceea ce privește forma de disc biconcav a celulei eritrocitare și încărcarea electrică a acesteia, s-au propus *modele electrostatice* care, pornind de la expresia câmpului

electric în interiorul unei membrane cu dublă încărcare electrică, pe baza unor calcule matematice complexe, conduc la concluzia că valoarea minimă a energiei electrostatice implică o suprafață și un volum care concordă cu forma de disc biconcav (Figura 74).

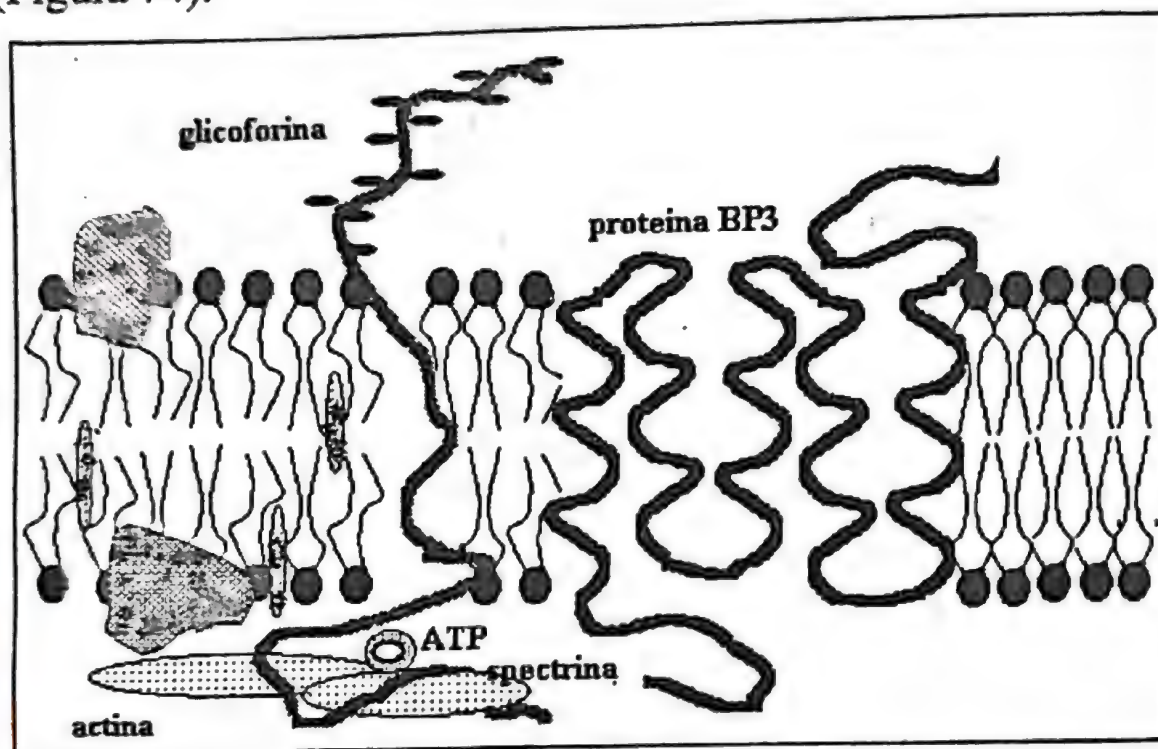


Figura 75. - Modelul structural al membranei eritrocitului (Alberts B. și col. 1989)

Unul din aspectele importante ale endotilului ca și cele referitoare la proprietățile membranei eritrocitului este deformabilitatea sa, evidențiată mai ales la trecerea acestor celule prin vase sangvine de diametre foarte mici - vasele capilare, cu diametre de 5-10 microni (Figurile 75 și 76).

Comportamentul reologic complex al sângelui global cât și al eritrocitului și cele de chemotaxis al leucocitului a condus la elaborarea unor modele mecanice ce exprimă în primul rând proprietățile de elasticitate și vâscozitate ale citomembranelor (Leliebre și Bucheriri, 1998).

Modelul eritrocitar (F. Topoliceanu și I.Haulică 1991; F. Topoliceanu și Polydoru 2000), include un ansamblu de corpuri elastice, reprezentate schematic prin resoarte cu diverse module de elasticitate precum și prin corpuri de tip amortizor corespunzătoare unor discuri ce se deplasează cu frecare în lichide vâscoase, newtoniene cu diferiți coeficienți de vâscozitate.

Unul din resorturile ideale este legat în paralel cu unul din corpurile vâscoase ideale, acest subsistem fiind înseriat cu alte două resorturi ideale și cu încă un corp ideal vâscos.

Relațiile cantitative care descriu comportarea mecanică a celor două tipuri de corpuri (Figura 77) idealizate sunt date de formulele următoare; pentru corpul elastic ideal recunoaștem legea lui Hooke, de proporționalitate directă între efortul unitar și deformația relativă iar pentru corpul perfect vâscos avem relația de proporționalitate între efortul unitar și viteza de variație a deformației relative:

$$\sigma = E \epsilon$$

(128)

$$\sigma = \eta \dot{\epsilon}$$

(129)

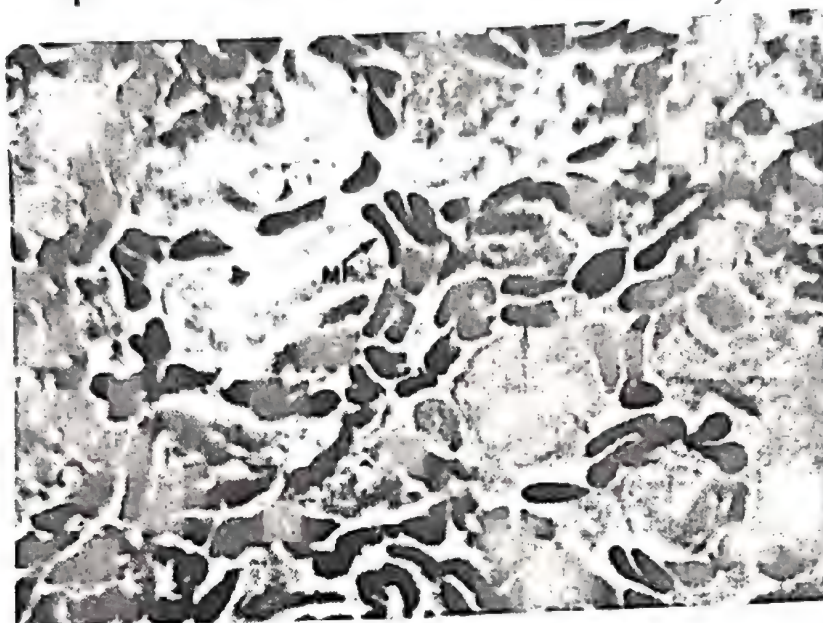


Figura 76. - Diferite distorsionări ale formei eritrocitului la trecerea prin capilarele ce înconjoară alveolele pulmonare (săgețile indică locurile unde câteva eritrocite sunt adiacente) (după Miyamoto și Moll citați de W. Hope 1983)

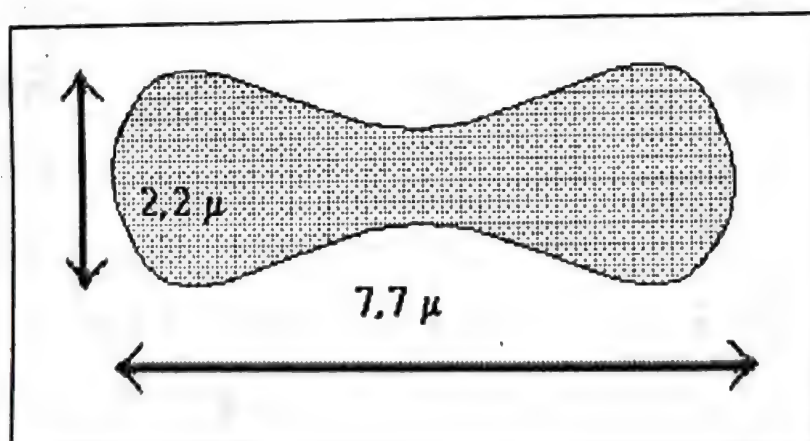


Figura 77. - Dimensiunile micronice definitorii ale profilului de disc biconcav al eritrocitului.

unde: σ este efortul unitar (F este forța și S este secțiunea transversală) iar ϵ este deformația relativă (Δl este deformația absolută, l_0 este lungimea inițială)

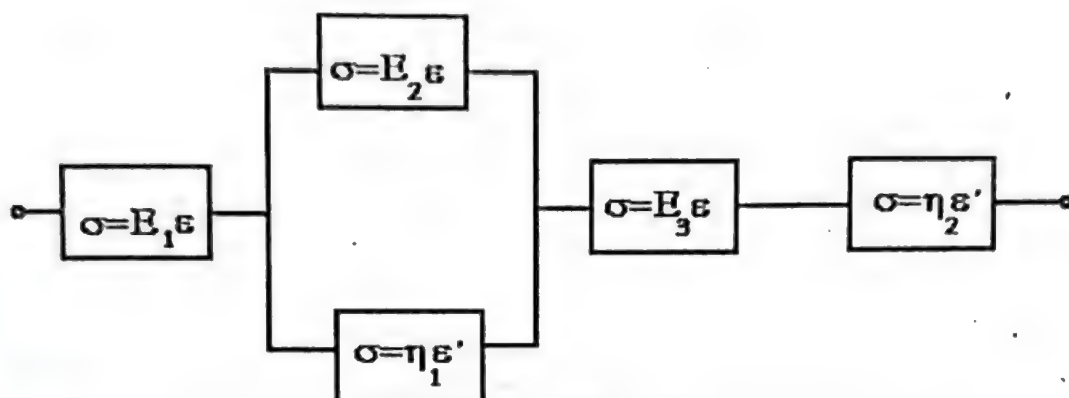


Figura 78. - Modelul mecanic propus pentru descrierea comportamentului reologic al membranei eritrocitare

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (130)$$

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (131)$$

$$\epsilon' = \frac{d\epsilon}{dt} \quad (132)$$

Eritrocitul este puternic implicat în funcțiile de transport ale oxigenului și dioxidului de carbon (între plămâni și celelalte țesuturi - Figura 79), prin intermediul hemoglobinei.

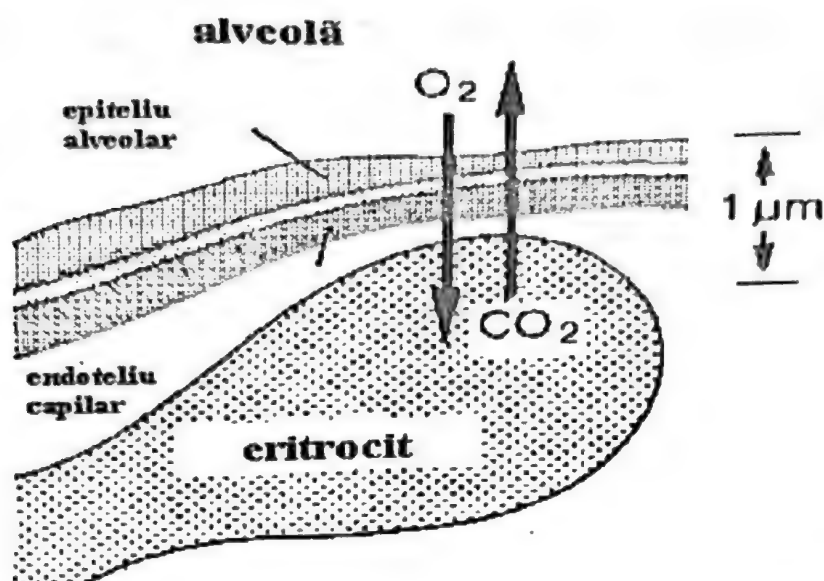


Figura 79. - Funcția de transport a oxigenului și bioxidului de carbon realizată de eritrocit (modificat după W. Hope și colab. 1983)

În mod normal membrana eritrocitului este permeabilă pentru aceste molecule și este normal să existe unele interacțiuni între componentele membranare și moleculele de hemoglobină (având în vedere și formele de oxi-hemoglobină, carboxihemoglobină, etc.).

Într-adevăr s-au evidențiat *legături electrostatice slabe și reversibile* între hemoglobină, proteine și lipide din membrana eritrocitului.

Glicoforina este susceptibilă de astfel de legături cu hemoglobina la nivelul capătului său intracelular ceea ce poate fi pus în corelație și cu influența pe care o are hemoglobina în disocierea complexului molecular spectrină-actină. Proteina

PB3 manifestă afinitate pentru oxihemoglobină și, mai slab, și pentru deoxihemoglobină.

13.2. Proprietăți plasto-vâsco-elastice și reologice ale sângelui

Eritrocitele au o pondere majoră în compoziția sângelui reprezentând circa 45% din volumul total sangvin, determinând, astfel în mare măsură și proprietățile reologice ale acestuia. Într-un model mecanic idealizat, sângele se comportă ca un corp *plasto-vâsco-elastic, nenewtonian, tixotrop* (coeficientul de vâscozitate poate să varieze în timp). Astfel, relația dintre efortul unitar și viteza de deformare nu mai corespunde unei drepte ce trece prin origine ci este dată de:

$$\sigma = \sigma_c + U \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (133)$$

în care: σ_c este o valoare critică a efortului unitar, sub care viteza de deformare rămâne constantă - egală cu o valoare prag, iar U este un coeficient de plasticitate, care dă panta dreptei (Figura 80):

$$\operatorname{ctg} \alpha = U \quad (134)$$

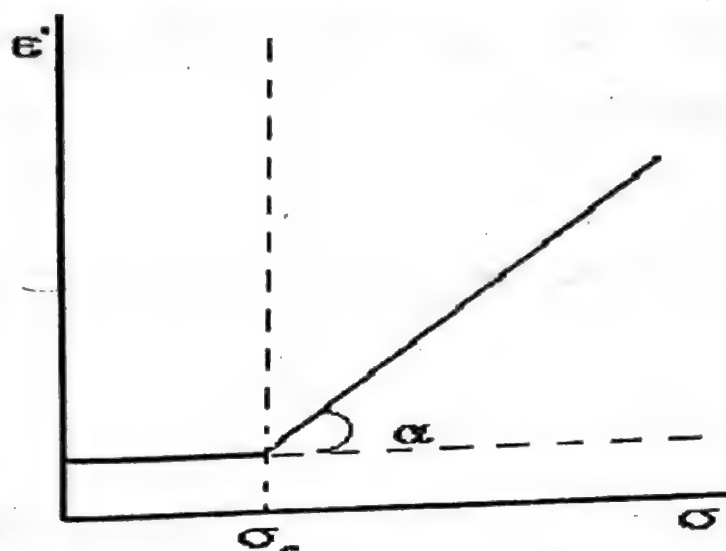


Figura 80. - Reprezentarea grafică a relației dintre constrângere (efort unitar) și deformația relativă descriu proprietățile plasto - vâsco - elastice ale sângelui (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

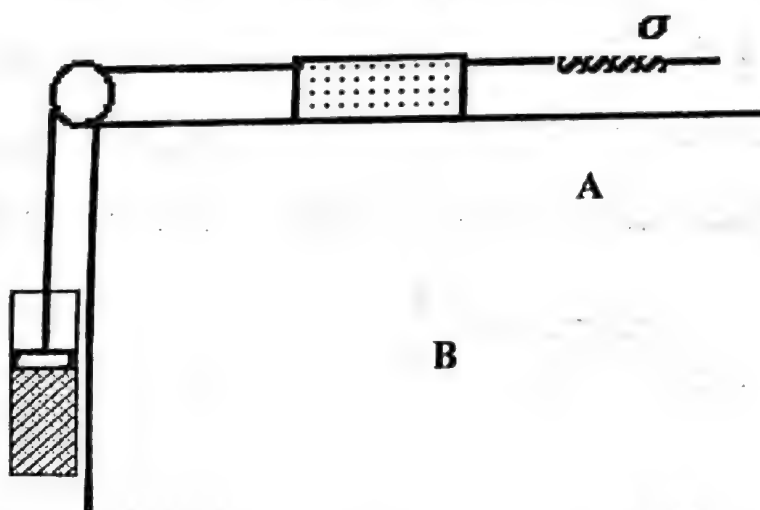


Figura 81. - Modelul mecanic propus pentru descrierea comportamentului mecanic al sângelui: corpul A din sistem se deplasează cu frecare sub acțiunea unei forțe aplicate prin intermediul unui resort elastic iar corpul B din sistem se deplasează cu frecare în interiorul unui lichid vâscos, newtonian (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Comportarea reologică poate fi descrisă prin cea a sistemului alcătuit dintr-un corp de tip amortizor (un disc ce se mișcă într-un lichid vâscos, newtonian), conectat printr-un fir inextensibil și netorsionabil cu un corp rigid ce se deplasează cu frecare pe o suprafață plană sub acțiunea unei forțe ce se exercită prin intermediul unui resort.

Forța ce acționează asupra resortului poate produce deplasarea sistemului de corpuri numai după ce efortul unitar depășește valoarea critică, astfel că înainte de atingerea acestei valori avem numai deformarea elastică a resortului (Figura 81).

După depășirea valorii critice efortul unitar are două componente, cea constantă (valoarea critică) și cea proporțională cu viteza de deplasare a sistemului de corpuri, depinzând și de rezistența lichidului newtonian.

13.3. Legea lui Bernoulli și numărul lui Reynolds pentru curgerea sangvină

Curgerea sangvină se efectuează cu viteze diferite în funcție de diametrul vaselor de sânge străbătute, numărul lui Reynolds având valori destul de mici pentru majoritatea acestor vase ceea ce corespunde unei curgeri laminare. Excepție poate

face aorta ascendentă, al cărei diametru de câțiva cm este de natură să favorizeze uneori o curgere turbulentă (Tabelul 10).

Sângele reprezintă în același timp o soluție apoasă de ioni și molecule, dar și o suspensie de celule, evidențiată prin intermediul profilului liniilor de curent la curgerea staționară: celulele curg cu viteză constantă (Figura 82) printr-un 'tub' central, iar plasma sangvină la periferie curge cu viteze mai mici. Gradientul de viteze scade către pereții vasului.

Deși nu se respectă legea lui Poisseulle, se verifică legea lui Bernoulli și ecuația de continuitate, demonstrată prin cateterism vascular și prin tehnica markerilor radioactivi.

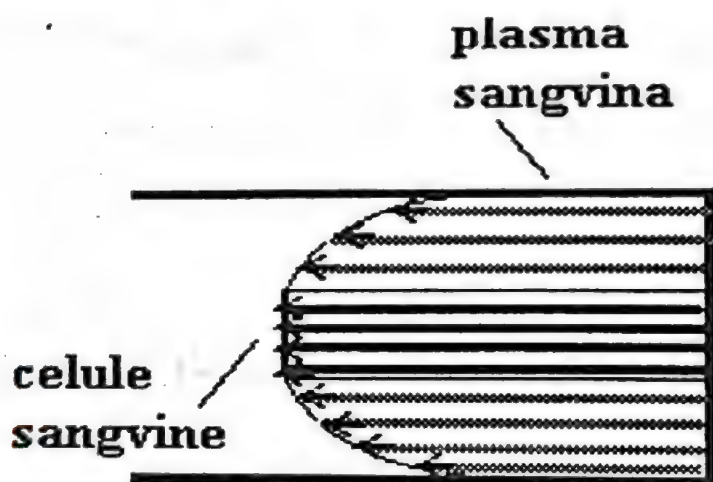


Figura 82.- Vitezele de curgere laminară a sângelui prin vasele sangvine scad de la centru spre pereți după un profil parabolic (corespunzător plasmelor sangvine) dar sunt constante și maxime în tubul central de linii de curent care corespunde curgerii elementelor figurate (după F. Gremy și J. Perrin 1975).

Tabelul 10. - Diametrele vaselor sangvine și vitezele de curgere laminară a sângelui (după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Vasul sangvin	Diametrul (cm)	Viteza maximă (cm/s)	Numărul lui Reynolds
Capilare	0,0005-0,001	0,05-0,1	0,01
Vene	0,5-1,0	15-20	400
Vena cavă	2,0	10-15	700
Artere	0,2-0,6	20-50	400
Aorta ascendentă	2,0-3,2	60	4500
Aorta descendentă	1,6-2,0	30	1500

$$P + \rho g z + \frac{1}{2} \rho v^2 = X - E = \text{const.} \quad (135)$$

$$vs = v's'$$

unde: P este presiunea hidrostatică, ρ este densitatea, v este viteza de curgere, z este altitudinea iar E este pierderea de energie pe unitatea de volum cauzată de frecările interne (vâscozitate) și regăsită îndeosebi sub formă de căldură, v și v' sunt vitezele prin două secțiuni cu suprafețele transversale s și s' .

În legătură cu proprietățile reologice ale sângelui, trebuie de menționat că, apa cu ionii și moleculele mici dizolvate în ea (care constituie *serul sangvin* împreună cu

macromoleculele prezente) se comportă, în primă instanță ca un lichid newtonian (la care vâscozitatea nu depinde de timp sau de constrângerea aplicată).

13.4. Semnificația fizică a presiunii hidrostatice a sângelui.

Tensiunea arterială

Presiunea hidrostatică a sângelui este o presiune radială (transmurală) dată de diferența de presiune între presiunea intravasculară P_{iv} și cea extravasculară, tisulară P_{ev} :

$$P = P_{iv} - P_{ev} > 0 \quad (136)$$

În pereții vaselor sangvine se exercită eforturi unitare circumferențiale, T_c , datorate proprietăților elastice ale acestora (Figura 83).

Din aplicarea principiului lucrului mecanic virtual se poate scrie egalitatea între lucrul mecanic L_p efectuat de P la o modificare dr a razei și lucrul mecanic L_T efectuat de tensiunea circumferențială T_c la modificarea corespunzătoare a circumferinței:

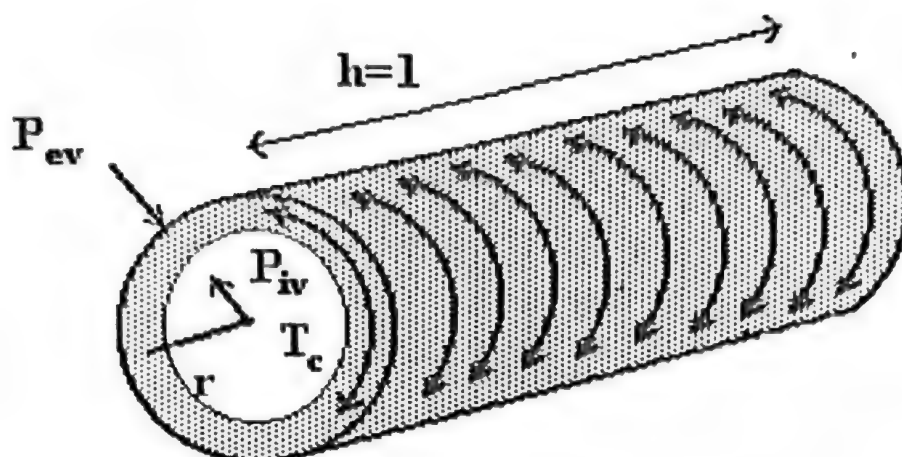


Figura 83. - Asupra pereților unui vas sangvin se exercită presiunea extravasculară, P_{ev} , presiunea intravasculară, P_{iv} și tensiunea circumferențială, T_c (după F. Gremy și J. Perrin 1975).

$$P \cdot 2 \pi r h d r = T_c \cdot 2 \pi d r \quad (137)$$

de unde:

$$P r = T_c \quad (138)$$

Măsurătorile arată că presiunea hidrostatică din vene este sensibil mai mică decât în artere dar raza unei secțiuni venoase este mai mare decât pentru o aortă astfel că tensiunea circumferențială este de același ordin de mărime în ambele cazuri.

13.5. Proprietăți reologice ale pereților vaselor sangvine

Cu excepția capilarelor și sfincterelor precapilare, toate vasele sangvine (arteriale și venoase) conțin în structura pereților lor, pe lângă fibre musculare și fibre elastice (elastină și collagen). Luate separat, elastina și collagenul se comportă ca niște corpuri Hooke (perfect elastice) cu module Young diferite (elastina este cea mai elastică, cu un modul de elasticitate de 6 ori mai mare decât al cauciucului). În constituția pereților vaselor sangvine (Figura 84) ele se comportă însă ca niște corpuri Kelvin (vâsco - elastice, cu histerezis - deformare remanentă).

Curba constrângere-deformație $[T_c(r)]$ obținută prin degradarea elastinei cu tripsină (deci pentru collagen) are o pantă mai mare decât cea obținută pentru elastină, prin degradarea collagenului cu acid formic. Curba corespunzătoare peretelui vascular are o alură intermediară, frântă.

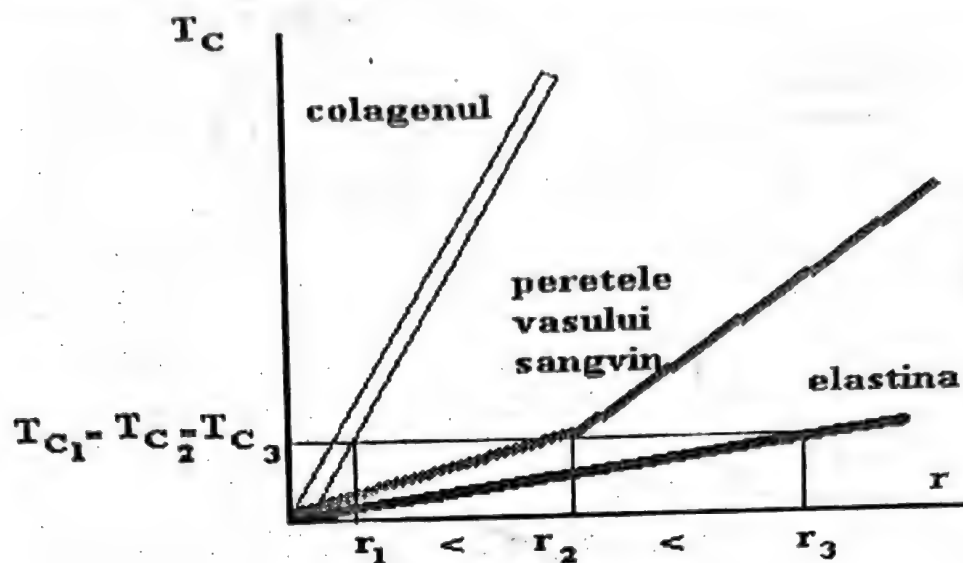


Figura 84. - Ilustrarea calitativă a proprietăților elastice ale pereților vaselor sangvine comparativ cu elastina și colagenul. La aceeași tensiune circumferențială, T_c , deformația, r , a elastinei este mai mare ca cea a peretelui vasului sangvin și mult mai mare decât cea a colagenului (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

13.6. Anastomoza artero-venoasă

La nivelul anastomozei artero-venoase întâlnim formațiuni de tipul sfincterelor precapilare și a corpurilor glomici care sunt constituite în principal din elemente structurale musculare și aproape complet lipsite de proprietăți elastice.

Anastomoza artero-venoasă șuntează joncțiunea capilarelor arteriale cu cele venoase asigurând optimizarea funcției sângelui de hrănire a țesuturilor periferice vascularizate (Figura 85).

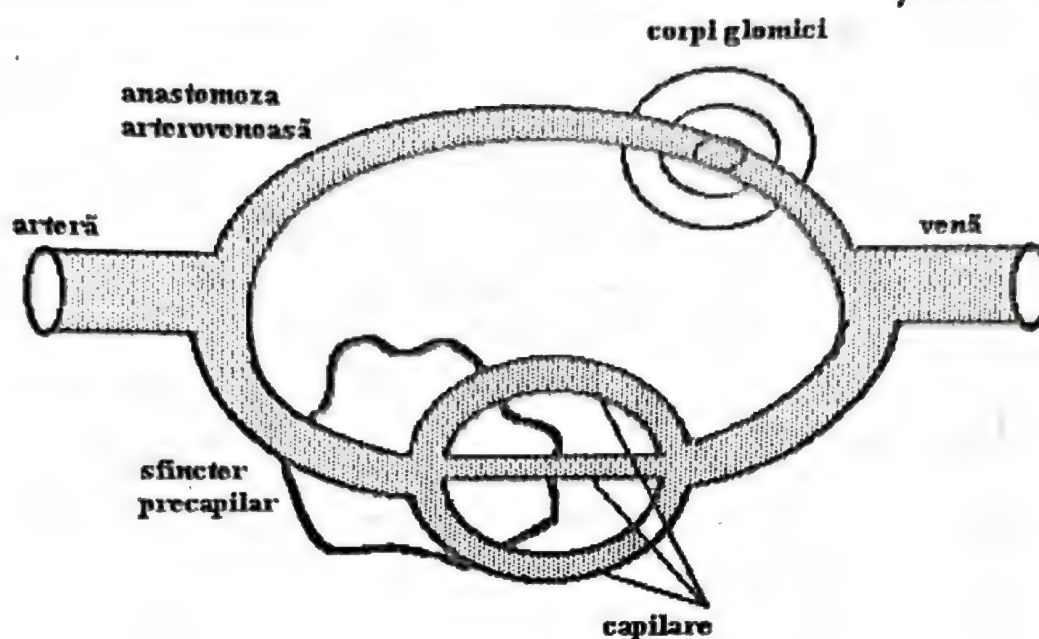


Figura 85.- Anastomoza artero-venoasă (modificat după J. Gremy și F. Perrin 1971).

Sângele este dirijat prin anastomoza artero-venoasă ca urmare a contractării sfincțerelor precapilare și relaxării corpiilor glomici. Când sfincțerele precapilare se relaxează atunci sângele circulă prin capilare, anastomoza artero-venoasă fiind închisă de corpii glomici (Baran D. și Topoliceanu F., 1999).

13.7. Elasticitatea și histerezis

Explicarea proprietăților vâsco-elastice ale sângelui, pe de o parte, și ale pereților vaselor sangvine, pe de altă parte, necesită prezentarea deosebirilor dintre reologia corpurilor de

acest fel numite corpuri Kelvin și a corpurilor elastice - corpuri Hooke - (Figura 86).

În cazul corpurilor elastice, comportarea deformației la variația constrângerii se poate reprezenta ca în figura de mai jos. Când constrângerea (efortul unitar, σ) crește de la zero (punctul A) atunci și deformația relativă ϵ crește proporțional (legea lui Hooke) din zero până în punctul B. Scăderea constrângerii pornind din punctul B până la valoarea inițială zero conduce la scăderea deformației *pe același drum* până la aceeași valoare de zero.

Variația în sens opus a constrângerii, din A în E implică variația în sens opus a deformației după o dreaptă cu aceeași pantă ca în primul caz. Revenirea constrângerii la punctul de zero este însoțită de revenirea deformației la punctul de zero *pe același drum*. Întreaga energie mecanică preluată de corp sub formă de energie de deformație elastică este restituită în final.

În cazul corpurilor Kelvin avem de-a face cu o elasticitate cu histerezis adică o parte din energia mecanică transmisă corpului sub formă de energie de deformație elastică se transformă în energie calorică. Este vorba tocmai de suprafața închisă de curba care descrie variația deformației relative la variația constrângerii. Să vedem cum se ajunge la această curbă poligonală închisă.

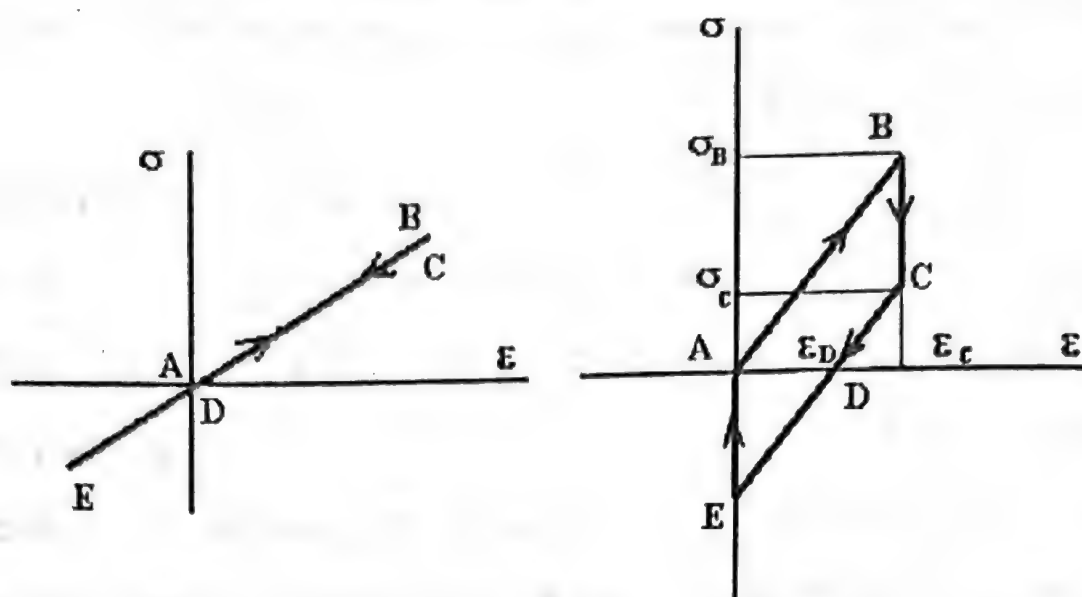


Figura 86. - Comportarea unui corp Hooke în comparație cu un corp Kelvin (J. Gremy și F. Perrin 1975).

După ce ajunge la valoarea σ_B constrângerea începe să scadă pe porțiunea BC dar deformația nu scade ci rămâne la valoarea ϵ_C . Din punctul B constrângerea continuă să scadă de la valoarea σ_C până la zero antrenând de această dată și scăderea deformației de la ϵ_C până la valoarea σ_D diferită de zero. Pentru ca și deformația relativă să revină la valoarea inițială nulă trebuie aplicată o constrângere de sens opus (porțiunea DE). Valoarea nulă a deformației relative obținută prin aceste transformări se păstrează pe durata readucerii la zero a constrângerii (porțiunea EA).

În concluzie, o parte din energia furnizată de pompa cardiacă pentru dirijarea circulației sângelui prin sistemul de

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARA

vase sangvine se transferă pereților vaselor sangvine sub formă de energie termică (se disipă). O descriere completă a proprietăților reologice ale acestor corpuri vâsco-elastice, care prezintă nu numai o constantă de elasticitate dar și una de vâscozitate ar necesita și o curbă de relaxare $\sigma = f(t)$ corespunzătoare unei deformării ce variază dreptunghiular precum și o curbă de fluență $\epsilon = g(t)$ corespunzătoare unei constrângeri cu variație dreptunghiulară.

Menționăm încă o dată că și membrana eritocitară este descriptibilă prin intermediul unei combinații de corpuri elastice și vâscoase care explică într-o primă aproximație comportamentul său în timpul curgerii sângelui prin capilare (deformabilitatea) și se leagă de forma sa biconcavă (Figura 87) care este susținută, desigur și de citoscheletul format dintr-o rețea fibrilară macromoleculară atașată în anumite puncte la membrana eritrocitului.

În această rețea fibrele de actină sunt bine reprezentate, determinând proprietăți similare cu cele ale corpurilor glomici și sfincterelor precapilare.

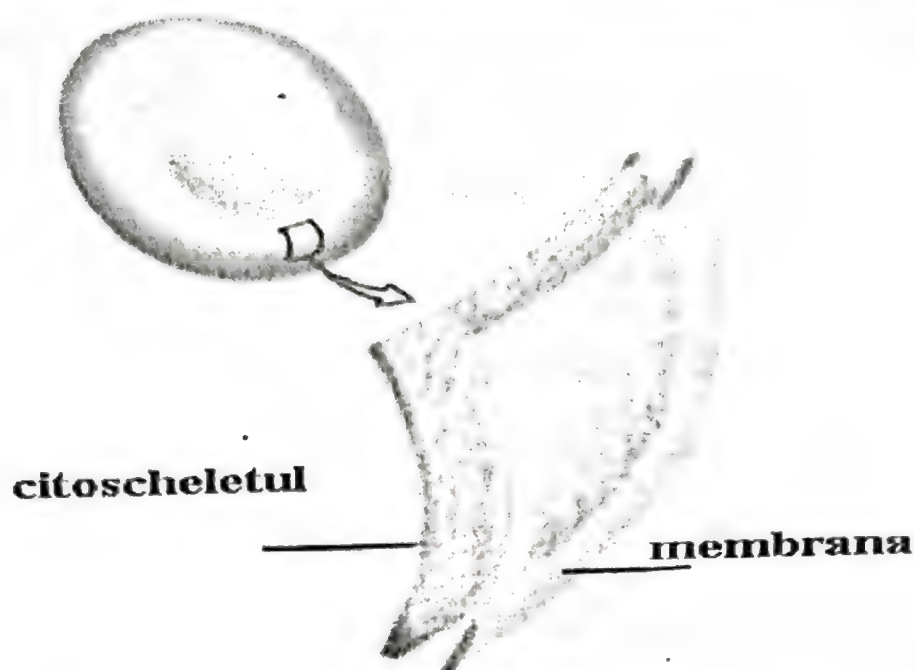


Figura 87.- Forma biconcavă și deformabilitatea eritrocitului sunt asigurate de proprietățile vâscoelastice ale membranei precum și de existența citoscheletului (J. Darnell și .col. 1990)

13.8. Impedanța vasculară la curgerea sangvină

În modelarea matematică a curgerii sangvine se poate considera '*pompa cardiacă*' acționând cu o forță ritmică pentru întreținerea pulsării sângelui în vasele sangvine. Proprietățile de elasticitate ale acestora permit analogia cu un balon de cauciuc cu un gât rigid, umplut cu un lichid incompresibil (Figura 88). Se notează cu S secțiunea transversală a gâtului, cu V volumul balonului, cu Δp variația de presiune aplicată la nivelul secțiunii S . Variația de volum corespunzătoare dilatării pereților sangvini se notează cu v . Dacă se respectă legea lui

Hooke (manifestarea proprietăților de elasticitate perfectă) atunci se poate scrie:

$$\Delta p = E \epsilon \quad (139)$$

unde: Δp reprezintă efortul unitar, α iar ϵ este deformarea relativă adică:

$$\epsilon = \frac{v}{V} = \frac{\Delta p}{E} \quad (140)$$

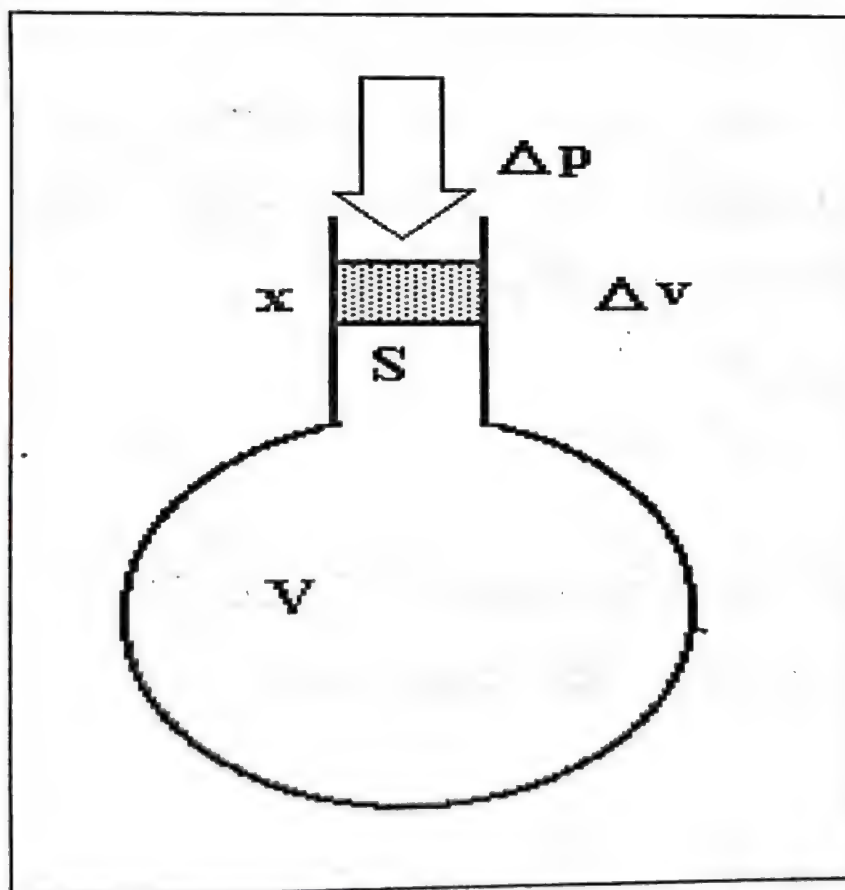


Figura 88. - Reprezentarea simbolică a proprietăților elastice ale vaselor sangvine (după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Variația de volum a balonului corespunde scăderii nivelului lichidului din gâtul balonului cu x :

$$v = Sx \quad (141)$$

Ca urmare a proprietăților elastice ale balonului, apare forța de retragere f_R astfel că:

$$f_R = -\Delta p S = -\frac{ES^2}{V} x \quad (142)$$

Pentru a scrie ecuația de mișcare se consideră că masa de lichid deplasată este m iar forța de frecare, datorată vâscozității este proporțională cu viteza lichidului:

$$f_\eta = R \frac{dx}{dt} \quad (143)$$

Forța eliberată de '*pompa cardiacă*' fiind considerată periodică, de pulsație ω ecuația de mișcare are forma:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} + R \frac{dx}{dt} + \frac{ES^2}{V} x = F_{\max} \cos \omega t \quad (144)$$

Comparând cu ecuația de la circuitul RLC serie, alimentat de o sursă de tensiune alternativă:

$$L \frac{dI}{dt} + RI + QU_C = U_m \cos \omega t \quad (145)$$

se poate observa că, impedanța la curgerea sangvină are o formă perfect analogă cu cea din electricitate dacă se împart toți termenii cu S^2 , adică R/S^2 este analogul rezistenței, m/S^2 este analogul inductanței iar E/V este analogul capacității electrice:

$$|Z| = \sqrt{\frac{R^2}{S^4} + \left(\frac{m\omega}{S^2} - \frac{E}{V} \frac{1}{\omega} \right)^2} \quad (146)$$

În mod similar se poate exprima și defazajul dintre forța periodică dezvoltată de mușchiul cardiac și debitul sangvin (a cărui măsură poate fi deplasarea x din modelul de mai sus) ca și condiția de rezonanță.

13.9. Modelul analogic al circulației sangvine

Unul din primele și cele mai simple modele ale circulației sangvine este totuși diferit de circuitul RLC serie

căci este de fapt un circuit mixt și prezintă doi condensatori (Figura 89). Ca urmare a existenței impedanței vaselor sangvine după modelul de mai sus, forța motrice a curgerii sangvine apare ca o funcție armonică ce a suferit o redresare monoalternanță și o netezire datorată elementelor capacitive.

Elementele capacitive reprezintă deformabilitatea remanentă a pereților arterelor - aceștia sunt capabili să stocheze o parte din energia de deformare în timpul circulației

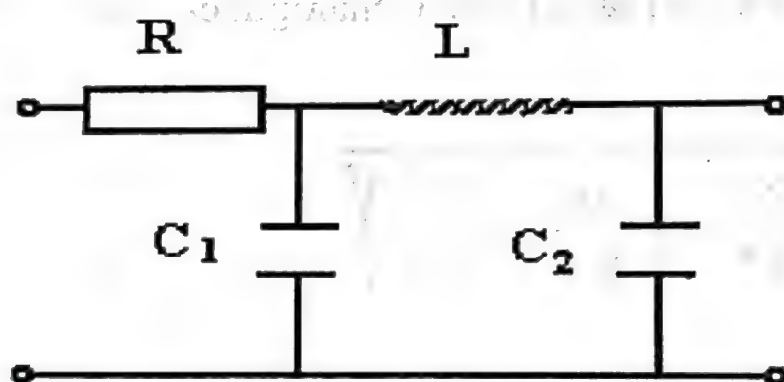


Figura 89. - Model fizic al impedanței la curgerea sangvină în accepția analogiei cu circulația unui curent electric printr-un circuit mixt (J. Gremy și F. Perrin 1975).

sângelui de la o ejecție sistolică și să o restituie parțial când elementul inductiv (inerția masei sangvine) începe să frâneze debitul arterial.

Ritmul cardiac prezentând o sistolă și o diastolă presiunea sangvină va înregistra alternativ o presiune sistolică

(mai amplă) și una diastolică (mai redusă). (Figura 90)

Presiunea medie pentru o perioadă, T , este:

$$P_m = \frac{1}{T} \int_0^T P dt \cong \frac{P_{\text{sist}} + 2 P_{\text{diast}}}{3} \quad (147)$$

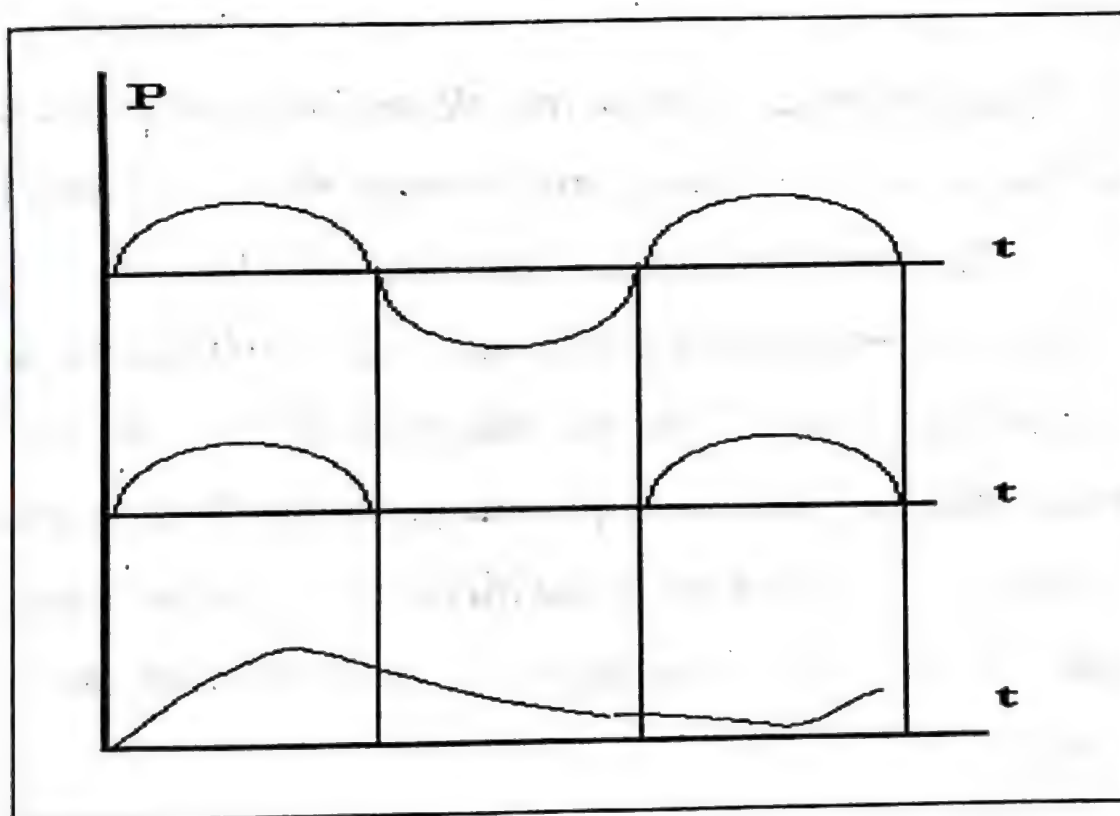


Figura 90. - Presiunea periodică exercitată de pompa cardiacă se transformă într-un 'semnal' redresat și netezit ca urmare a existenței impedanței de curgere a sângelui (după F. Gremy și J. Perrin 1975).

Dintre funcțiile complexe îndeplinite de acest lichid circulant esențial pentru organismele animale superioare, am

menționat deja transportul oxigenului și bioxidului de carbon între țesutul pulmonar și celelalte țesuturi și amintim funcția de transport a substanțelor nutritive și a celor eliminate de organism, funcția de stabilizare a concentrațiilor ionice, funcția de termostaziere, etc.

13.10. Studiul circulației sanguine cu ajutorul trasorilor

Vom reda pe scurt două modele stochastice capabile să reprezinte circulația sângelui prin sistemul de vase: modelul tubului cu bile de sticlă și modelul compartimentelor seriate.

Un proces stochastic este un proces probabilistic iar cazul circulației sanguine se pretează la o astfel de modelare deoarece, deși se poate cunoaște situația inițială la momentul luat ca referință (la intrarea în labirintul cu care este asimilat sistemul de vase), totuși cunoașterea situației la ieșire este un fapt probabilistic.

Aceasta deoarece există un mare număr de vase prin care se poate dirija masa de lichid luată în studiu - marcată cu ajutorul unui trasor - și determinarea pozițiilor în care se vor găsi particulele de lichid marcat la ieșire necesită o analiză probabilistică - singura capabilă să ajute la prezicerea funcțiilor lor de distribuție.

În *modelul tubului cu bile de sticlă* (care se poate realiza ca atare relativ ușor) , se consideră că lichidul marcat cu trasor colorat, de exemplu, este introdus la momentul inițial la unul din capetele tubului (capătul A). În momentul injectării această masă de lichid ocupă o zonă densă, relativ restrânsă și omogenă.

Un lichid incolor (simbolizând plasma sangvină din sistemul circulator al organismului uman) antrenează cantitatea de lichid colorat din poziția A în poziția B astfel că deplasarea globală, x , a centrului zonei colorate, este rezultatul deplasării aleatorii ale particulelor colorate printre bilele de sticlă. O curbă a densității de particule colorate, ca o funcție de x , $F(x)$, va reprezenta tocmai curba de probabilitate a prezenței unei particule de trasor într-un punct de abscisă x .

La începutul mișcării aleatorii a trasorului antrenat de lichidul incolor printre bilele de sticlă care delimitează numeroase drumuri posibile majoritatea particulelor de trasor sunt plasate pe o distanță relativ mică (dispersie redusă) astfel că probabilitatea de a găsi o particulă în zona de la începutul tubului este relativ mare. Numai un număr mic de particule colorate reușesc să ajungă la distanțe mai mari de capătul de intrare, astfel că probabilitatea de a găsi la distanță mare o particulă colorată este relativ mică. Deci curba de probabilitate

este asimetrică, având maximumul deplasat spre valorile mici ale lui x (curbă de tip Poisson).

Cu timpul, particulele colorate care ajung la distanțe medii crește iar un număr relativ mic rămân poziționate atât la distanțe mici cât și la distanțe mari. Deci curba de distribuție spațială devine o curbă simetrică (tinde la o curbă Gaussiană). Axa de simetrie a curbei se deplasează cu viteză constantă în lungul tubului.

În *modelul compartimentelor înseriate* se consideră că sistemul circulator este alcătuit dintr-un număr foarte mare de compartimente identice legate în serie (Newman și col. citați de F. Gremy, 1982). Pentru a urmări modul cum se deplasează sângele într-un astfel de sistem se introduce o cantitate de traser în primul compartiment urmând ca particulele marcate să încerce să treacă în compartimentul al doilea și apoi mai departe.

Tentativele de trecere dintr-un compartiment în altul reușesc numai cu o anumită probabilitate.

Starea staționară spre care tinde sistemul este caracterizată de cantitatea de substanță S în fiecare compartiment.

Utilizarea unui traser radioactiv, pentru acest sistem de detecție a radiației, se urmărește circulația lichidului marcat prin intermediul activității specifice:

$$a_i(t) = \frac{s_i(t)}{S} \quad (148)$$

unde: i desemnează compartimentul iar s_i este cantitatea de traser (substanță marcată) din compartimentul respectiv.

Ecuția diferențială care descrie cinetica trasorului este de forma:

$$\frac{ds_i(t)}{dt} = \rho a_{i-1} - \rho a_i \quad (149)$$

Ecuția arată că viteza de creștere a cantității de traser din compartimentul considerat crește proporțional cu cantitatea existentă în compartimentul precedent și scade proporțional cu cantitatea din compartimentul considerat, ρ fiind viteza de refacere (de *turn - over*). Rezultă imediat că:

$$S \frac{da_i(t)}{dt} = \rho (a_{i-1} - a_i) \quad (150)$$

Se poate demonstra prin metoda inducției matematice că:

$$a_i(t) = \frac{a_{(0)}}{(i-1)!} \left(\frac{\rho t}{S} \right)^{i-1} e^{-\frac{\rho}{S}t} \quad (151)$$

unde: simbolul ' $!$ ' reprezintă operația de '*factorial*'. Într-adevăr să verificăm relația pentru $i=1, i=2, \dots$:

(1) $i=1$ arată că:

$$a_i(t) = \frac{a_{(0)}}{1} e^{-\frac{\rho}{S}t} \quad (152)$$

adică:

$$\frac{da_1}{dt} = -\frac{\rho}{S} a_{(0)} e^{-\frac{\rho}{S}t} \quad (153)$$

(2) $i=2$ arată că:

$$a_2(t) = \frac{a_{(0)}}{1!} \frac{\rho t}{S} e^{-\frac{\rho}{S}t} \quad (154)$$

adică:

$$\frac{da_2}{dt} = \frac{\rho}{S} a_{(0)} e^{-\frac{\rho}{S}t} - \left(\frac{\rho}{S}\right)^2 t \cdot e^{-\frac{\rho}{S}t} = \frac{\rho}{S} (a_1(t) - a_2(t)) \quad (155)$$

și așa mai departe. În fine, acest mod de demonstrație presupune că dacă relația este valabilă pentru un i dat atunci se demonstrează că ea este valabilă pentru $i+1$.

Formal relația propusă este de tipul distribuției Poisson:

$$P(p) = \frac{e^{-x} x^p}{p!} \quad (156)$$

unde: $P(p)$ este probabilitatea de a se obține p încercări reușite în condițiile în care numărul mediu (medie pe ansamblu) de încercări reușite este egal cu x .

Pentru $i-1$ mic (puține compartimente de străbătut - puține încercări p care garantează efectul scontat) (ca și în cazul când, în modelul precedent trasorul colorat străbate o distanță mică - cazul A) forma unei astfel de curbe este puternic asimetrică.

Ulterior când $i-1$ este mai mare, forma curbei de distribuție tinde să devină simetrică corespunzător (ca și în

modelul precedent - cazul B) unui p mare (mai multe particule marcate reușesc să ajungă în compartimentul considerat).

Cercetările întreprinse de grupul de lucru inițiat la Iași de regretatul Academician Petre Jitariu și continuate ulterior de colectivul Laboratorului de Biofizică condus de profesorul Mihail Isac, au acordat un loc aparte investigațiilor asupra celulelor sangvine, urmărind efectele acțiunii unor factori fizici de natură magnetică (P. Jitariu și col. 1967; M. Jitariu și col. 1965; P. Jitariu și M. Isac 1967; P. Jitariu, M. Jitariu și M. Isac 1967; M. Jitariu și col. 1970).

CAPITOLUL 14

Aspecte biofizice ale schimburilor de gaze respiratorii

Dacă la *organismele unicelulare* schimbul de gaze, respectiv O_2 și CO_2 , cu mediul înconjurător, se efectuează prin simpla *difuzie* a acestora *prin membrana celulară*.

La *organismele pluricelulare*, încep să se diferențieze “aparate” specializate care fac posibilă *fixarea oxigenului pe lichidul circulant sangvin, transportul lui la țesuturi, preluarea dioxidului de carbon și eliminarea acestuia în afara organismului*.

La nevertebrate gazele respective se dizolvă direct în lichidul circulant, în timp ce la vertebrate ele se combină cu hemoglobina aflată numai în celulele lichidului circulant.

Structura aparatului respirator diferă după tipul organismului - la animalele superioare, vertebrate, s-au dezvoltat plămânii.

Plămânii comunică cu exteriorul prin căile respiratorii, care sunt reprezentate de: *cavitățile nazale, laringe, trahee și*

bronhii prin care aerul ajunge la plămâni. Fiecare din cele două *bronhii* se ramifică în 15 sau mai multe *bronhiole* care, la rândul lor se ramifică într-o serie de *canalicule alveolare* ce au ca terminații unele formațiuni microscopice saciforme, numite *alveole pulmonare*.

Alveola pulmonară este formată dintr-o *membrană subțire de țesut conjunctiv* și elastic. Prin interior este captușită cu un *strat epitelial alveolar* de tip lamelar. În peretele alveolar se găsesc numeroase *capilare sangvine* separate de alveolă numai printr-un strat subțire de *endoteliu* (barieră monocelulară semipermeabilă) din care sunt alcătuiți pereții vaselor capilare. Datorită grosimii foarte mici a membranei care separă aerul din alveola de sânge ($0,4 \mu\text{m}$) cât și numărului mare de alveole (300 milioane) se realizează o suprafață de contact foarte mare (90 m^2) astfel că cei aproximativ 70 ml de sânge care înconjoară alveolele să fie încărcăți cu oxigen și eliberați de dioxid de carbon în mai puțin de 1 secundă.

În *sângele arterial*, concentrația gazelor este aceeași ca și în aerul alveolar. În *sângele venos* concentrațiile și presiunile parțiale ale oxigenului și dioxidului de carbon sunt diferite determinând difuzia oxigenului din alveole în sângele venos și a dioxidului de carbon din sângele venos în alveole, de unde este eliminat prin expirație. *Transportul acestor gaze prin*

ansamblul format de endoteliul capilar și epiteliul alveolar este echivalent cu difuzia printr-o membrană de 2-3 nm.

14.1. Parametrii schimbului pulmonar de gaze

Parametrii schimbului de gaze de la nivelul țesutului pulmonar sunt:

- (a) ventilația alveolară $-(v_a)$: volumul de gaz (ΔV) transportat prin convecție de la exterior spre alveole și revers în unitatea de timp (Δt) :

$$v_a = \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (157)$$

- (b) capacitatea de difuzie $-(c_d)$: volumul de oxigen sau bioxid de carbon schimbat între amestecul de gaz alveolar și sângele din capilarele plămânului în unitatea de timp pe unitatea de presiune parțială (p_A) :

$$c_d = \frac{\Delta V}{\Delta t \Delta p_A} \quad (158)$$

(c) perfuzia $-(d_v)$: volumul de sânge care trece prin rețeaua de capilare a plămânului în unitatea de timp:

$$d_v = \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (159)$$

(d) distribuția - neomogenitățile locale ale celor trei parametri de mai sus în interiorul plămânului.

Ventilația alveolară se referă la cantitatea din aerul inspirat care ajunge efectiv să participe la schimbul de gaze de la nivelul alveolelor. Pentru un adult normal în stare de repaus fizic volumul total inspirat în unitatea de timp este de circa 7 litri / minut din care 70% ajunge la alveole, adică ventilația alveolară este de 5 litri / minut.

Presiunile parțiale ale oxigenului și bioxidului de carbon sunt:

$$\begin{aligned} P_{AO_2} &= P_{O_2}^i - 115 \frac{V_{O_2}^u}{V_A^u} \\ P_{ACO_2} &= 115 \frac{V_{CO_2}^u}{V_A^u} \end{aligned} \quad (160)$$

unde V reprezintă debitele volumice de oxigen sau bioxid de carbon în condiții standard (presiunea de 1 atmosferă și temperatură de zero grade Celsius) sau ventilația alveolară în

condiții fiziologice iar $P^i_{O_2}$ este presiunea parțială a oxigenului inspirat.

Deci o creștere în ventilația alveolară duce la o creștere a presiunii parțiale a oxigenului din aerul alveolar. Deoarece hemoglobina din sânge este saturată cu oxigen creșterea ventilației alveolare nu crește efectiv cantitatea de oxigen care ajunge la țesuturi.

În schimb scăderea presiunii bioxidului de carbon din aerul alveolar duce la o eliberare mai mare de bioxid de carbon și o reducere a presiunii parțiale a acestui gaz urmată de o creștere a valori pH - ului.

Presiunile parțiale ale bioxidului de carbon din aerul alveolar și din sângele venos sunt diferite substanțial: 5,3 kPa (40 mmHg), respectiv 6,1 kPa (46 mmHg). La fel și cele ale oxigenului: 13,3 kPa (100 mmHg), respectiv 5,3 kPa (40 mmHg). Aceste diferențe de presiune determină difuzia gazelor respiratorii la trecerea sângelui prin capilare. Având în vedere că gazele sunt transportate de hemoglobina din eritrocite, rezistențele întâmpinate de procesul de difuzie sunt date de epiteliul alveolar, interstițiul, endoteliul capilar, plasma sangvină, interiorul eritrocitului. Difuzia este guvernată de legea Fick (enunțată într-un capitol anterior):

$$j = - D \text{grad} C \quad (161)$$

unde j este fluxul (cantitatea de substanță în unitatea de timp), $\text{grad } C$ este gradientul concentrației pe direcția difuziei iar D este coeficientul de difuzie. Conform legii lui Henry, între concentrație și presiunea parțială există relația:

$$C = \alpha P \quad (162)$$

în care coeficientul de solubilitate α este constant pe spațiul de difuzie. Introducând coeficientul lui Krogh sau conductivitatea de difuzie:

$$K = \alpha D \quad (163)$$

se obține:

$$j = - K \text{grad} P \quad (164)$$

Exprimând fluxul de oxigen difuzat ca volumul ce trece în unitatea de timp prin unitatea de suprafață, avem:

$$V_{O_2} = KS \frac{\partial P_{O_2}}{\partial x} \quad (165)$$

Trecând la variații finite pe distanța Δx dintre spațiul alveolar și capilarul pulmonar găsim capacitatea de difuzie:

$$c_{dO_2} = \frac{V_{O_2}^{\text{alveolar}}}{\Delta p_{AO_2}} = \frac{KS}{\Delta x} \quad (166)$$

La un adult normal la care captarea oxigenului se face în ritmul de 300 ml/min și presiunile parțiale ale oxigenului sunt cele de mai sus se obține o capacitate de difuzie de 230 ml/min kPa.

Perfuzia este practic dictată de ritmul cardiac. Numai o mică parte a sângelui (1-2 %) nu trece prin țesutul pulmonar ajungând din vene direct în artere. Acest sânge scurtcircuitat poate fi în proporție mai mare în unele cazuri patologice, o scădere în presiunea parțială a oxigenului și o creștere a presiunii parțiale a bioxidului de carbon producându-se în artere. În repaus, la adultul normal perfuzia sângelui ajunge la 5 litri / minut. Schimbul de gaze este favorizat la nivelul acelor eritrocite care își accentuează convexitatea ca urmare a proprietăților lor de deformabilitate la trecerea prin capilare foarte înguste.

Distribuția valorilor mărimilor fizice prezentate mai sus prezintă neomogenități considerabile chiar pentru un organism perfect sănătos iar în situații patologice este de așteptat amplificarea lor, ceea ce duce în principal la scăderea presiunii parțiale a oxigenului și la creșterea celei a bioxidului de carbon. Pentru evaluarea calitativă și cantitativă a neomogenităților locale ale distribuției ventilației și perfuziei s-a utilizat scintigrafia pulmonară.

Tehnica propusă de West (citată de W. Hope ș.a., 1983) se bazează pe măsurarea în diferite zone ale toracelui a cantității de bioxid de carbon radioactiv inspirat.

În schimb tehnica propusă de Thews și Vogel se bazează pe inspirarea a trei gaze radioactive cu diferite proprietăți de difuzie: CO_2 difuzează bine, O_2 moderat iar Ar foarte greu. Spectrometria de masă a fost utilizată pentru determinarea concentrațiilor acestor gaze. Din valorile diferite ale constantei de timp de eliminare a bioxidului de carbon, oxigenului și argonului se obțin informații despre distribuția funcțională a ventilației alveolare, perfuziei pulmonare și capacității de difuzie a oxigenului.

Din punct de vedere funcțional s-au identificat două compartimente, fiecare formate dintr-un număr mare de alveole răspândite în ambii plămâni: un compartiment bine ventilat

($\dot{V}_{A1} = 4$ litri / min) și altul slab ventilat ($\dot{V}_{A2} = 1,6$ litri / min) dar ambele cu valori aproape egale ale perfuziei ($d_{v1} = 2,7$ litri / min, respectiv $d_{v2} = 2,5$ litri / min) și capacității de difuzie a oxigenului $c_{d1} = 100$ ml / min kPa și respectiv $c_{d2} = 135$ ml / min kPa. Rezultă imediat că rapoartele ventilație - perfuzie nu sunt aceleași în cele două compartimente.

14.2 Modelul matematic al schimburilor de gaze

Acest model, propus de Kroch, este denumit și modelul cilindrului lui Kroch (Figura 91), deoarece se referă la analiza distribuției spațiale a presiunii parțiale a oxigenului într-un țesut ipotetic de formă cilindrică, alimentat de un vas de sânge capilar de-a lungul axei cilindrului.

Ecuția diferențială adecvată este de forma:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial P}{\partial r} + \frac{\partial^2 P}{\partial z^2} = \frac{A}{K} \quad (167)$$

unde P este presiunea, r și z sunt coordonatele axială și radială, K este constanta lui Kroch iar A este rata de consumare, care

apare în cea de-a doua ecuație a lui Fick, descriind difuzia, și anume:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C - A \quad (168)$$

unde C este concentrația iar D este coeficientul de difuzie. La echilibru variația în timp a concentrației este nulă astfel că rata de consumare rămâne egală cu produsul dintre laplaceianul concentrației (derivata de ordinul doi în raport cu coordonatele spațiale) și coeficientul de difuzie:

$$A = D \nabla^2 C \quad (169)$$

Dacă se are în vedere că difuzia axială a oxigenului este neglijabilă față de cea radială:

$$\frac{\partial P}{\partial z} \rightarrow 0 \quad (170)$$

Atunci ecuația diferențială propusă mai sus se simplifică:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial P}{\partial r} = \frac{A}{K} \quad (171)$$

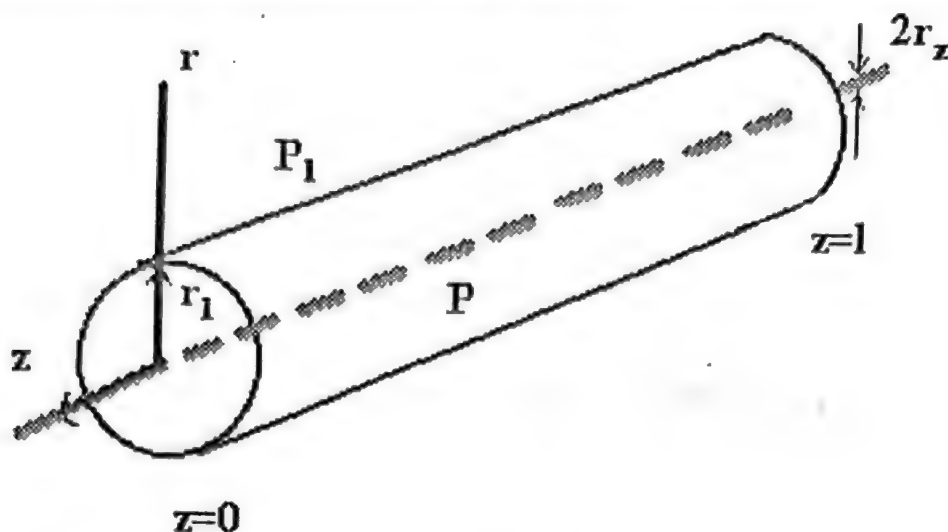


Figura 91. - Cilindrul lui Krogh modelează presiunea parțială a oxigenului într-un cilindru de țesut alimentat cu sânge de la un capilar central, axial

Condițiile la limită sunt de forma:

$$\frac{\partial P}{\partial r} = 0 \text{ pentru } r = r_z \text{ și } \frac{\partial P}{\partial z} = 0 \text{ pentru } z = 0, z = l \quad (172)$$

Se introduce noțiunea de valoare critică a presiunii (și corespunzător, valoarea critică a razei cilindrului) pentru a marca existența unei valori maxime a vitezelor reacțiilor enzimatice condiționate de oxigen:

$$P = P_{cr} \text{ și } \frac{dP}{dr} = 0 \text{ pentru } r = r_{cr} \quad (174)$$

Ecuția pentru calcularea razei critice de alimentare cu oxigen :

$$r_{cr}^2 \left(2 \ln \frac{r_{cr}}{r_1} - 1 \right) = \frac{4K}{A} (P_1 - P_{cr}) - r_1^2 \quad (175)$$

Astfel, pe baza acestui model se poate determina distanța radială pe care alimentarea cu oxigen este suficientă pentru buna desfășurare a reacțiilor enzimatice și, implicit, delimitarea zonei insuficient alimentate cu oxigen.

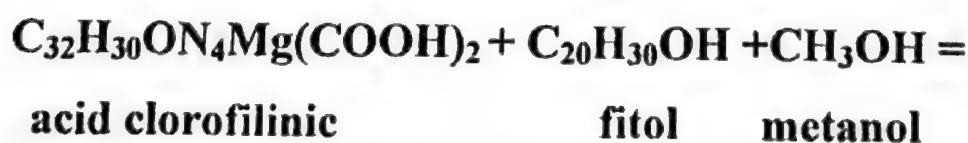
CAPITOLUL 15

Biofizica fotonică

15.1. Biofizica pigmentilor fotosintetizatori

Din membranele cloroplastelor ţesuturilor vegetale ale plantelor, s-au extras mai multe tipuri de pigmenti fotosintetizatori dintre care cei mai răspândiţi sunt: *clorofila a*, *clorofila b*, *carotenul β* şi *carotenul α* . Mai pot fi întâlniţi: *xantofila*, *bacterioclorofila* (la bacteriile sulfuroase verzi şi purpurii) *fucoxantina* (în algele brune), *ficoeritrina* şi *ficocianina* (pigmenţi ficobilieni, puţin reprezentaţi în cloroplastele frunzelor verzi ale plantelor superioare, dar frecvent întâlniţi în algele roşii şi respectiv albastre).

Clorofila a este rezultatul esterificării acidului clorofilinic (clorofilina) cu alcoolul metilic (metanol) şi cu un alt alcool, cu molecula mai mare, fitolul:





Clorofila

apa

În formula structurală se disting patru inele pirolice (heterocicli pentanonici cu câte 4 atomi de carbon și unul de azot) și un homociclu pentanonic - cu 5 atomi de carbon. Atomul de magneziu din centrul acestei structuri este legat de cele patru inele pirolice prin patru legături de coordinație (Figura 92).

La *clorofila b*, în locul unei grupări metilice (CH_3), care este atașată unuia din inelele pirolice de la clorofila *a*, apare o grupare a aldehidei formice ($\text{C}=\text{OH}$). Această aparent minoră deosebire structurală, face ca în spectrele electronice să apară deplasări semnificative ale maximelor benzilor de absorbție și a celor de fluorescență din vizibil.

Din cauza numărului mare de atomi de carbon și de hidrogen fitolul conferă clorofilei proprietăți hidrofobe și lipofile (de insolubilitate în apă și de solubilitate în acizi grași).

Clorofila *a* se poate atașa la multe molecule proteice din membrana cloroplastelor, ceea ce îi conferă o mai mare stabilitate la lumină deoarece, în stare izolată este repede fotooxidată până la feofitina *a*.

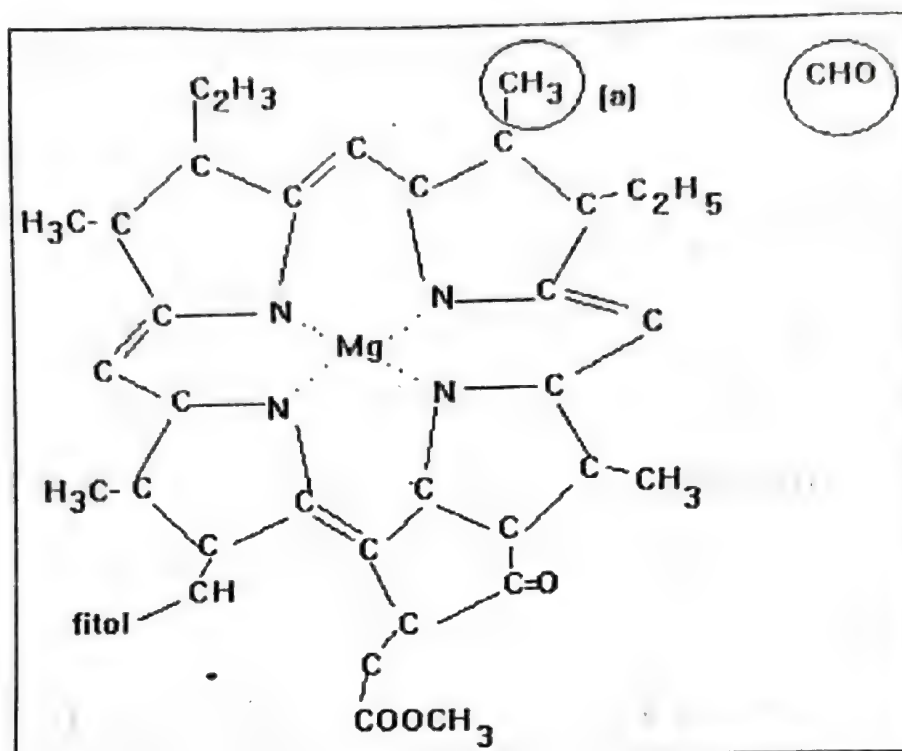


Figura 92 .- Structura clorofilelor *a* și *b*

Cele două tipuri de clorofile (*a* și *b*) nu se transformă una în alta, prin oxidoreduceri.

15.2. Spectrele pigmentilor fotosintetizatori în domeniul vizibil

Clorofilele absorb și pot emite fluorescent la ambele capete ale domeniului vizibil al radiațiilor electromagnetice adică și în subdomeniul roșu și în subdomeniul albastru (ceea

ce explică și culoarea lor verde gălbuie, corespunzătoare subdomeniului spectral care este emis de aceste molecule).

După cum s-a arătat mai sus, mediul de dispersie influențează poziția maximelor benzilor de absorbție, de aceea, descrierea spectrelor impune și precizarea solventului în care a fost preparată proba de clorofilă, după extragerea sa din planta studiată.

Maximele de absorbție în eter etilic sunt la 430 nm și respectiv 662 nm pentru clorofila **a**, iar pentru clorofila **b**, aceste maxime sunt la lungimile de undă de 453 nm și respectiv 642 nm (Figura 93).

Nivelele energetice între care se realizează tranzițiile corespunzătoare acestor maxime de absorbție, sunt nivelul fundamental, S_0 și nivelele excitate S_1^a și S_1^b (S de la cercetătorul Soret, care a cercetat aceste absorbții).

Nivelul fundamental este un nivel electronic de tip singlet, adică are multiplicitatea de spin egală cu 1 (cei doi electroni π moleculari implicați în tranzițiile electronice având spini antiparaleli), la fel cu cele două nivele excitate S_1^a și S_1^b , (Hochkoepler A. and all., 1995).

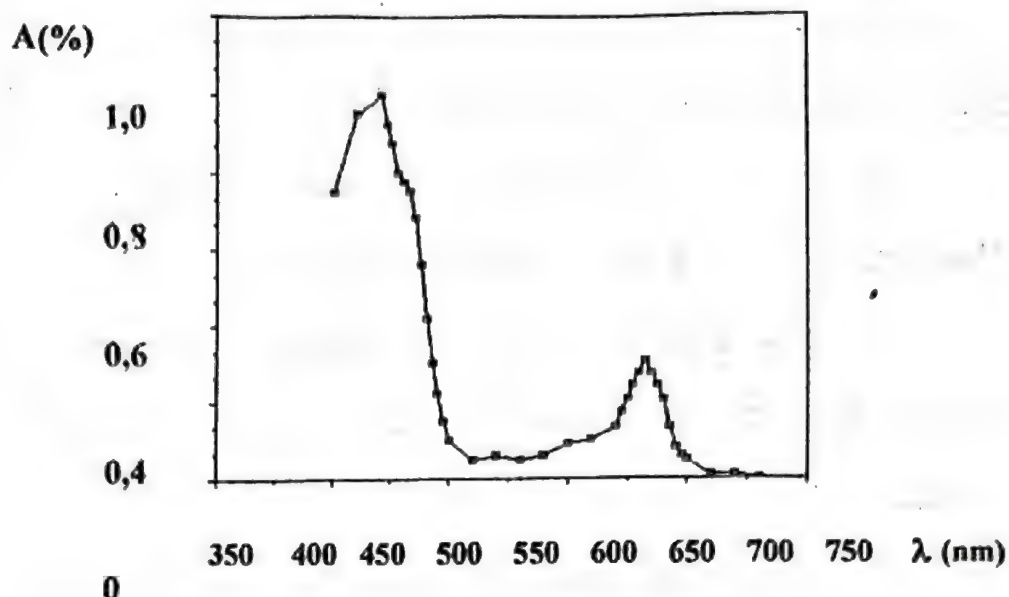


Figura 93. - Spectrul de absorbție al clorofilei *a* obținut în acetonă prin măsurători punctuale (M. Știrban, 1981)

Nivelul fundamental este un nivel electronic de tip singlet, adică are multiplicitatea de spin egală cu 1 (cei doi electroni π moleculari implicați în tranzițiile electronice având spini antiparaleli), la fel cu cele două nivele excitate S_1^a și S_1^b

$$\chi = 2S + 1 = 1$$

$$S = S_1 + S_2$$

$$S_1 = -S_2 = \frac{1}{2}$$

(176)

în timp ce nivelul **T** este un nivel electronic de tip triplet, adică are multiplicitatea de spin egală cu 3 (cei doi electroni au spini paraleli).

$$\chi = 2S + 1 = 3$$

$$S = S_1 + S_2 \quad (177)$$

$$S_1 = S_2 = \frac{1}{2}$$

Banda de absorbție din regiunea roșie a spectrului corespunde tranziției $S_0 - S_1^a$ iar banda de absorbție din regiunea albastră a spectrului corespunde tranziției $S_0 - S_1^b$ (Figura 94).

Absorbțiile altor pigmenți sunt redată în tabel (Tabelul 11).

Tabelul 11. Maximele de absorbție din vizibil pentru diferiți pigmenți din lumea vie (S. Neamțu și V. Tamaș 1986)

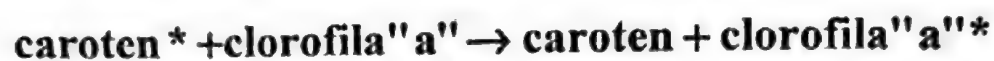
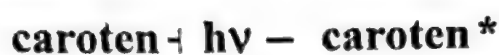
Pigmentul	Maximul de absorbție (nm)		
Carotenul β	452	482	
Carotenul α	446	476	
Xantofila	450	481	
Fucoxantina	452	470	
Ficoeritrina	457	566	
Ficocianina	616	-	
Bacterioclorofila	366	605	770

Ca urmare a tranziției $S_1^a - S_0$ se obține banda de emisie (*fluorescență*) din regiunea roșie a spectrului vizibil, iar prin tranziția $S_1^b - S_0$ banda de fluorescență din regiunea verde-albastru. Aceste tranziții sunt de tip radiativ (Figurile 94 și 95).

Numai clorofila *a* poate intermedia transformarea energiei electromagnetice în energie chimică; ceilalți pigmenți

susțin procesul fotosintetic prin transmiterea energiei electromagnetice absorbite, către clorofila a.

Astfel, rolul pigmentilor carotenoizi poate fi descris sintetic astfel:



unde indicele * desemnează starea energetică excitată a moleculelor.

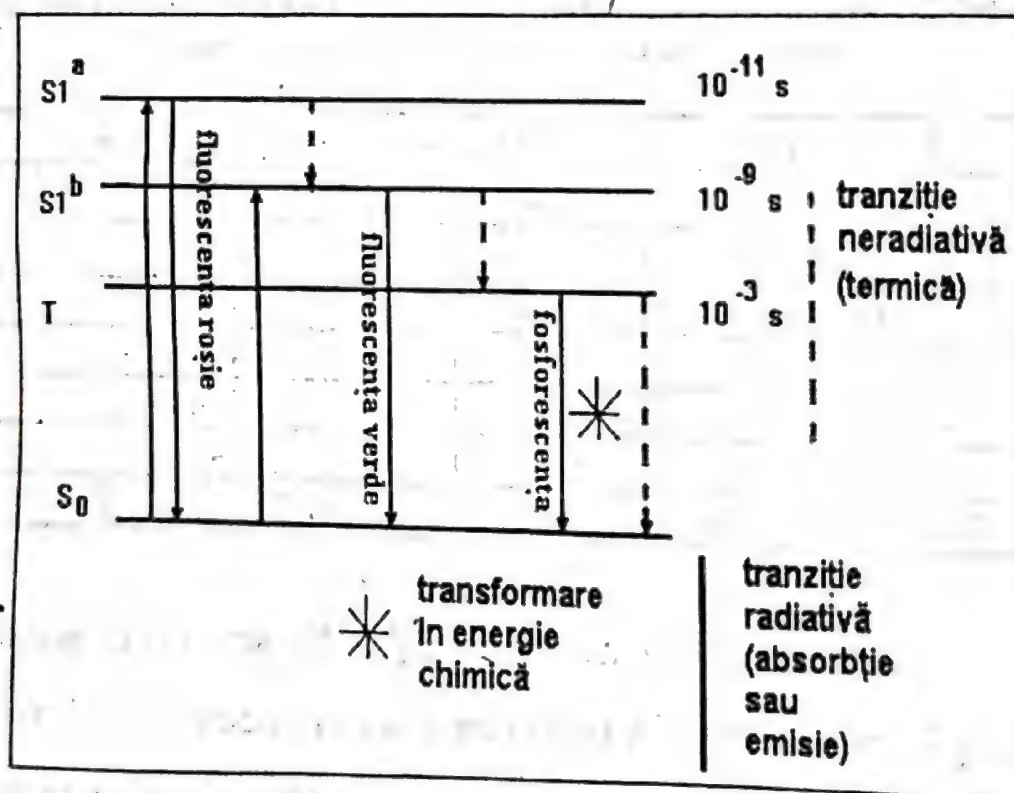


Figura 94. - Schema nivelurilor și tranzițiilor electronice în molecula de clorofilă a (S. Neamțu și V. Tamaș 1986)

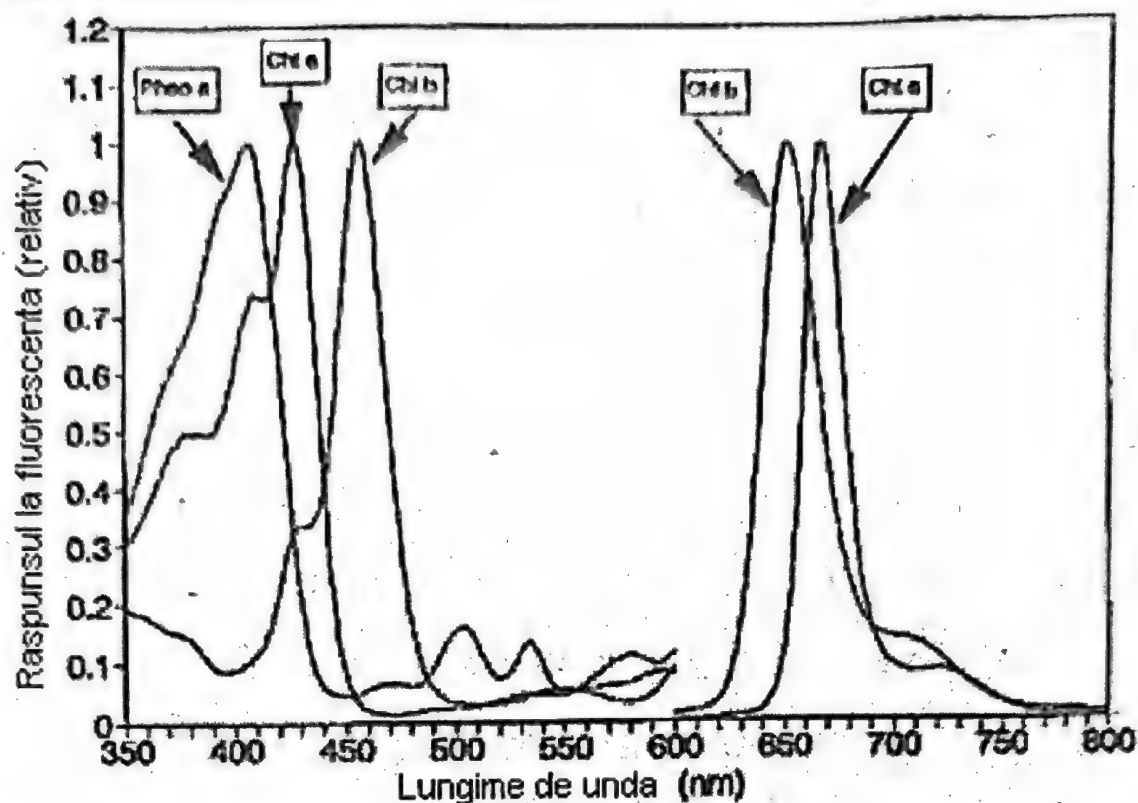


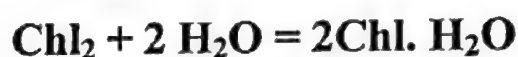
Figura 95. - Spectrele de fluorescență ale clorofilelor *a*, *b* și al feofitinei *a* (M. Știrban 1981)

Asociațiile moleculare ale clorofilei în mediu apos se bazează pe legături de hidrogen care stau la baza apariției unor dimeri hidratați de clorofilă *a*.

15.3. Interacțiunea clorofilei cu apa

S-a arătat că apa este într-o relație specială cu clorofila. Unele din primele rezultate experimentale obținute pe un amestec de clorofilă *a* și clorofilă *b* extrase din plante demonstrează că clorofilele și alchilclorofilidele conțin și apă în

proporție de 0,5 mol apă/ mol clorofilă. Raportul este însă variabil după cum se arată în alte experimente. Ulterior a fost demonstrat rolul esențial al apei în formarea clorofilei cristaline și deci interacțiunile apă - clorofilă au o semnificație structurală specială. Rappaport a demonstrat prin studii în spectrul infraroșu că în cazul în care clorofila a este dizolvată într-un solvent nepolar, cum este tetraclorura de carbon (CCl_4), apa se comportă ca o nucleofilă ce interacționează cu clorofila, conform ecuației:



Studii sistematice asupra *afinității pentru apă a clorofilei* s-au efectuat prin utilizarea clorofilei deshidratate, obținută prin diferite tehnici de uscare (vid, curent de azot, la diferite presiuni, temperaturi, prin solviri și evaporări succesive în și din mai mulți solvenți anhidri, la care se adaugă treptat cantități foarte mici de apă).

• Absorbția în spectrul infraroșu este unul din procedeele capabile să dea informații cantitative limitate despre raportul molar apă / clorofilă. Astfel banda de absorbție în spectrul infraroșu a legăturii O-H din apă, de la 3700 cm^{-1} este de intensitate diferită de zero pentru un conținut de apă mai mare

ca 10^{-5} mol în soluția de clorofilă studiată (la o grosime a cuvei de spectrofotometrie de 10 mm) sau pentru un conținut de apă de 10^{-3} mol dacă grosimea cuvei este de 10^{-1} mm.

Prezența semnificativă a apei (peste 100:1 moli clorofilă/ moli apă, deci 10^{-2} moli apă la un mol de clorofilă) se manifestă în spectrele de vibrație *prin apariția unei benzi măsurabile (cu intensitate diferită de zero) la circa 1638 cm^{-1} , simultan cu scăderea spre zero a intensității benzii de la 1695 cm^{-1} , ceea ce înseamnă apariția legăturii de hidrogen dintre apă și clorofilă la nivelul legăturii carbonil $\text{C}=\text{O}$, legătură ce vibrează la 1638 cm^{-1} ; în lipsa apei ar fi apărut banda de la 1695 cm^{-1} .*

Clorofila **b** este mult mai greu de deshidratat decât clorofila **a**, ceea ce indică o interacțiune mai puternică între apă și această moleculă de clorofilă. Starea stabilă a hidratului de clorofila **b** poate fi un trimer de clorofilă **b** monohidratată sau dihidratată.

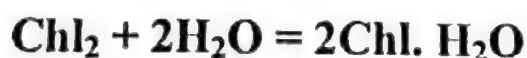
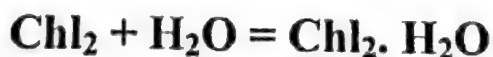
Clorofila **a** hidratată, așa cum pare să fie cea obținută prin procedeele standard, care nu limitează contactul cu aerul, deci și cu apa din aer, este de asemenea monohidratată. În spectrele din domeniul vizibil, lipsa maximelor de la 740 - 745 nm în cazul clorofilei **a** solvită în hidrocarburi alifatice, înseamnă lipsa apei sau prezența unui număr foarte mic de

monomeri de clorofilă hidratată ($\text{Chl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Această bandă din domeniul vizibil, este o expresie a legării unei molecule de apă la atomul de magneziu al moleculei de clorofilă.

Moleculele de clorofilă cu atomul de magneziu liber absorb la 665-673 nm. Când această bandă nu este prezentă, existența celei de la 740-745 nm, semnifică hidratarea maximă a moleculele de clorofilă (raportul clorofilă : apă este de 1:1). În acest caz se obține și o absorbție intensă la 1638 cm^{-1} dacă se folosește ca solvent, tetraclorura de carbon.

Apa, prezentă printre moleculele de clorofilă dispersate într-un solvent nepolar (ex.: CCl_4), se poate lega atât la atomul de magneziu (cu un număr de coordinație mai mare ca patru) cât și la gruparea carbonil, prin legătura intermoleculară de hidrogen.

Existența apei legată la carbonilul din molecula de clorofilă prin legătură de hidrogen este evidențiată de absorbția de la 3710 cm^{-1} , în timp ce prezența apei în stare monomerică liberă, prin absorbția de la 3615 cm^{-1} . Principalele două situații de echilibru posibil sunt:



În soluție, pot exista dimeri de clorofilă nehidratați, realizați prin legături la nivelul atomului de magneziu dintr-o moleculă și al grupării carbonil din alta.

Dimerul de clorofilă vibrează la 3665 cm^{-1} , vibrație ce poate să coincidă și cu vibrația legăturii O-H din monomerul de clorofilă prin legarea apei la atomul de magneziu ($\text{Mg}\dots\text{O}(\text{H})\text{O}$) și cu dimerul hidratat al clorofilei.

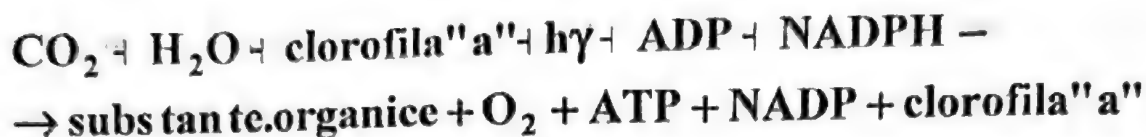
15.4. Fotosinteza

Fotosinteza, fenomenul complex prin care energia solară este convertită în energia chimică necesară sintezei de substanțe anorganice, în țesuturile plantelor verzi, autotrofe, se derulează numai datorită existenței clorofilelor din membranele cloroplastelor - organite citoplasmatiche specifice celulei vegetale.

Rolul clorofilei a este de catalizator al lanțului de reacții oxido-reducătoare prin care, pornind de la substanțe anorganice, ca apa și bioxidul de carbon, se sintetizează compuși organici precum glucidele, lipidele, aminoacizii, proteinele, etc.

Un mod de redare prescurtată a transformărilor complexe din cadrul fotosintezei trebuie să ia în considerare și

rolul compușilor macroergici din celulă (ATP - acid adenzinotrifosforic) și al transportorilor de electroni (NADP - nicotinamidinucleotidfosfatul):



Reacțiile condiționate de prezența luminii au fost denumite *reacții de lumină*, în timp ce un grup important de alte reacții, consecutive celor inițiale, se desfășoară în lipsa luminii, denumite *reacții de întuneric*.

Reacțiile de lumină sunt procesele fotosintetice de transport de electroni, declanșate de absorbția luminii în moleculele de clorofilă din primul sistem fotosintetic celular (Figura 96) (bazat pe molecule de clorofilă a de tip I, cu un maxim de absorbție la 700 nm). Patru astfel de molecule se energizează la nivelul electronilor π din învelișul electronic, aceștia părăsind clorofila care însă își recuperează pierderile, de la două molecule de apă ce suferă procesul de fotoliză.

Prin această reacție un număr de patru atomi de hidrogen (și patru electroni) sunt îndepărtați din moleculele de apă cu eliberarea consecutivă de oxigen.

Un al doilea centru fotosintetic (conținând o formă de clorofilă a care are o absorbție maximă la 680 nm) efectuează o a doua energizare a electronilor, o parte din energia aceasta fiind înmagazinată în NADP, care trece din forma oxidată, NADP^+ , la forma redusă, NADPH.

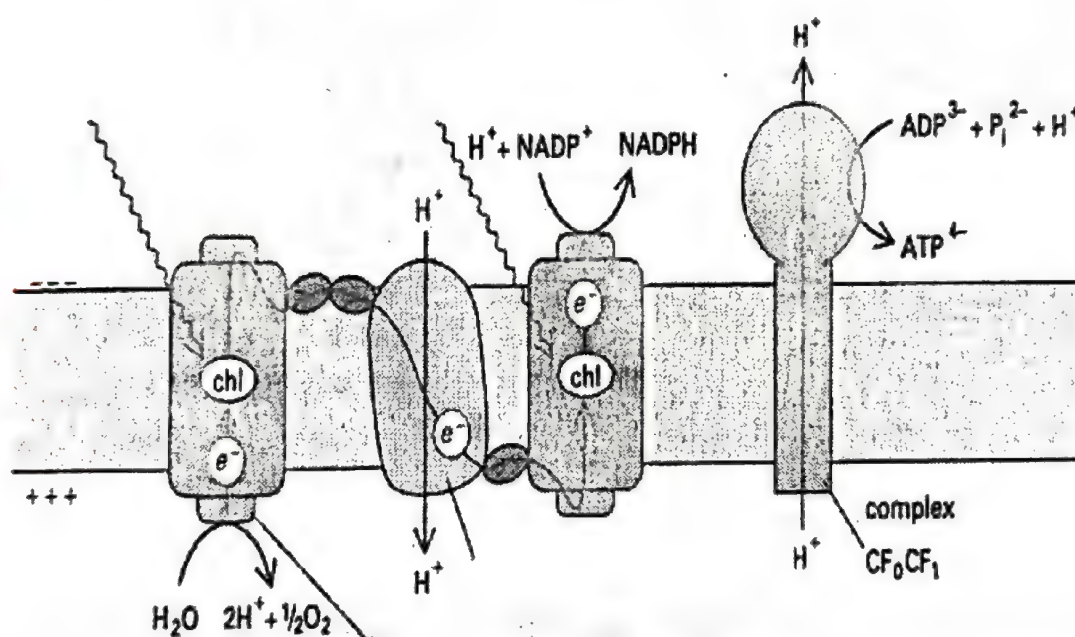


Figura 96. - Transformările moleculelor de apă, NADP și ADP în membrana cloroplastelor. Acumularea de energie în moleculele de ATP se efectuează la nivelul complexului CF_0CF_1 foarte asemănător cu ATP - sintetază mitocondrială (J. Darnell și col. 1990)

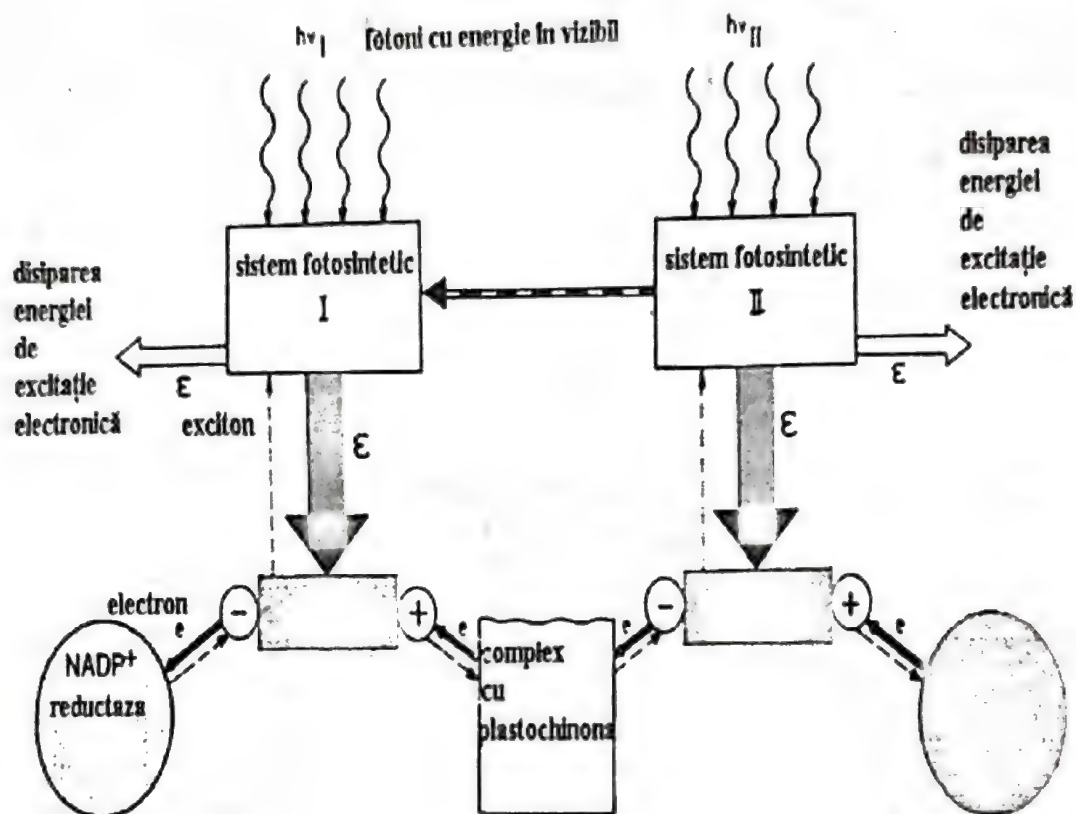


Figura 97. - Traseele fotonilor, electronilor și excitonilor din cloroplaste corespunzătoare energiei radiante absorbite, energiei din procesele de oxidoreducere și energiei de excitație electronică disipată (după W. Hope și col. 1983.)

Electronii încărcăți cu energia absorbită de clorofilă se dezenergizează de-a lungul unui șir de transformări oxido-reducătoare ale unui lanț de compuși ce formează lanțul respirator (o parte din energia cedată de ei fiind stocată în

molecula de ATP formată prin fosforilarea ADP), iar protonii sunt pompați în interiorul cloroplastului (Figurile 96 și 97).

Procesele sunt foarte mult asemănătoare cu reacțiile oxido-reducătoare specifice membranei interne a mitocondriale.

Mecanismul pompării fotonilor la nivelul complexelor proteice CF_0CF_1 se desfășoară concomitent cu sinteza ATP-ului (Figura 98). Pompele de fotoni sunt agregate proteice, cu presupusă constituție tripartită și activitate enzimatică (ATP - sintetază).

Reacțiile de întuneric permit sinteza compușilor organici (Figura 99) pe baza carbonului din bioxidul de carbon și a energiei înmagazinate de celulă (în moleculele de ATP) în decursul etapelor anterioare ale procesului.

Schemele propuse pentru descrierea acestor reacții sunt încă susceptibile de multe perfecționări, căci procesele ce se petrec în intimitatea celulei nu pot fi în totalitate înțelese din măsurători *in vitro* sau din determinări indirecte.

Importanța covârșitoare pe care fotosinteza o prezintă atât pentru regnul vegetal, cât și pentru cel animal, aproape în totalitate dependent de primul, face ca studierea sa în continuare, să preocupe intens lumea științifică.

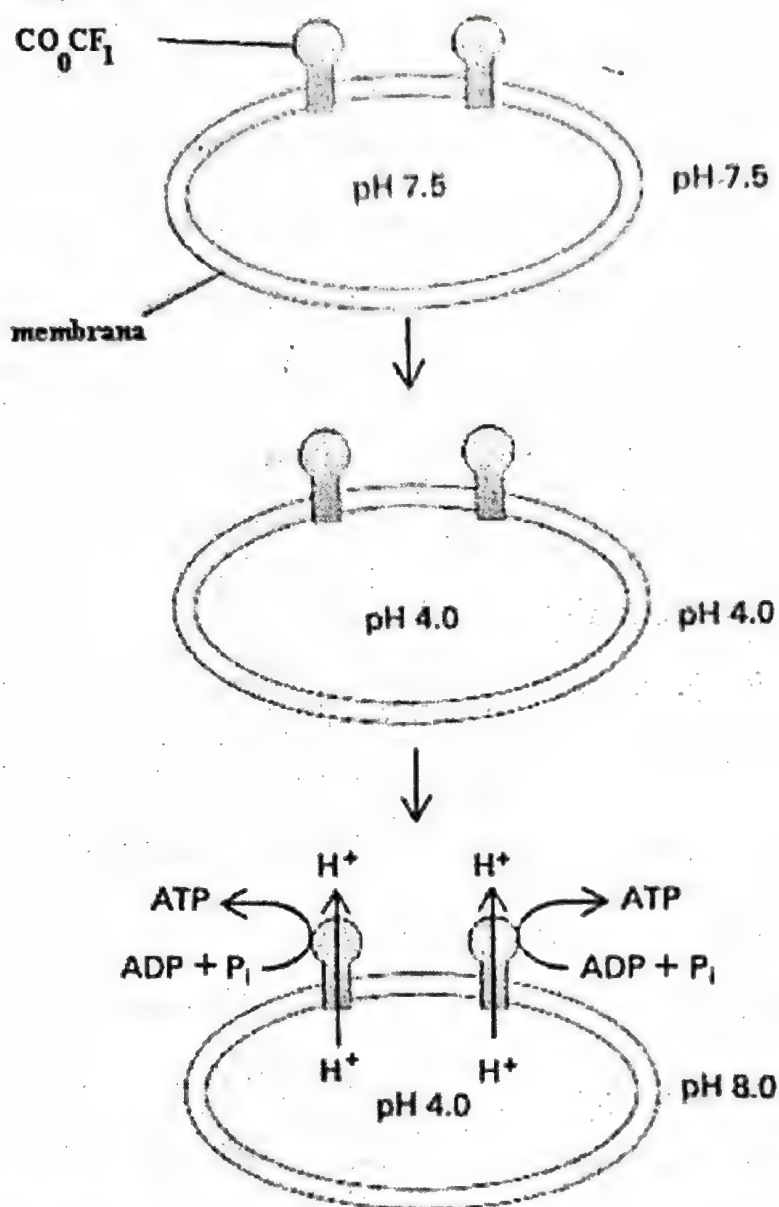


Figura 98. - Experimentele cu suspensii de vezicule conținând cloroplaste au arătat că un gradient de pH impus artificial (scăderea de la pH - 7,5 neutru, la pH - 4 acid) poate favoriza sinteza ATP-ului din ADP și fosfat (J. Darnell și col. 1990)

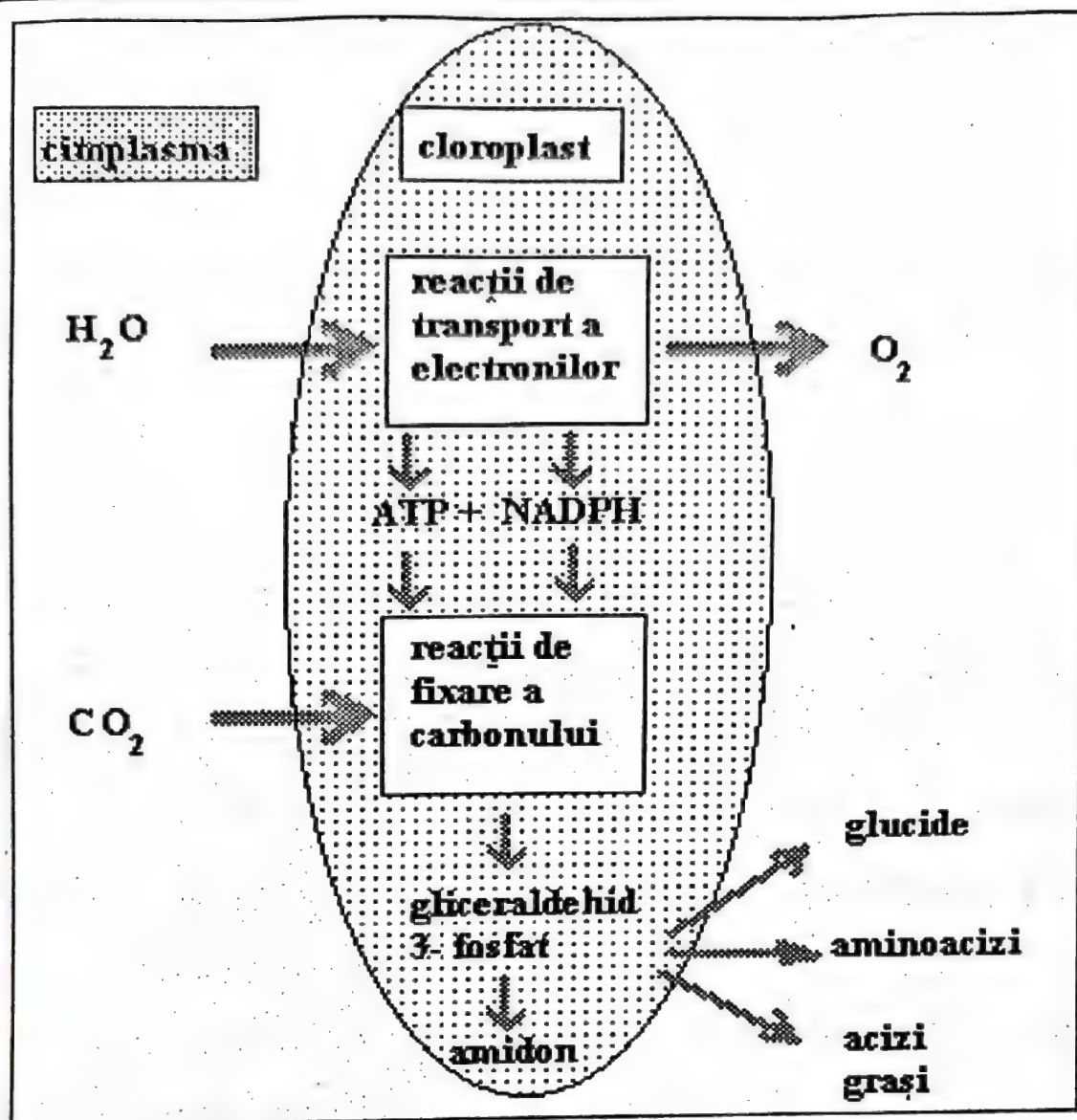


Figura 99. - Cele două grupe importante de reacții din cadrul fotosintezei (după Alberts și col. 1989)

Reproducerea în laborator a fotolizei apei ar putea, de exemplu, să asigure un combustibil ideal – hidrogenul - și să producă concomitent mari cantități de oxigen, ceea ce ar rezolva una din marile probleme contemporane ale omenirii.

Studii preliminare asupra influenței unor tratamente magnetice asupra pigmentilor clorofilieni au constituit subiectul unor preocupări relativ mai recente ale cercetătorilor biofizicieni și biologi ieșeni (D. E. Creangă și col. 1995; D. E. Creangă și col. 1996; A. Pavel și col. 1999).

15.5. Fotoluminescența

Unul dintre procesele cele mai fascinante din lumea vie este *bioluminescența*. Bioluminescența constă în emisia de radiații vizibile pe baza unui consum de energie chimică, reprezentând, sub unele aspecte, un proces invers fotosintezei specifice speciilor de plante superioare și în cazul unelor alge și bacterii autotrofe. Bioluminescența a fost pusă în evidență la câteva specii de vertebrate (pești) și la numeroase specii din categoria insectelor (licuricii fiind cei mai cunoscuți) și moluștelor precum și la diverse alge, bacterii, protozoare.

La animale, bioluminescența este comandată de sistemul nervos ale cărui terminații inervează organul bioluminescent. Influxul nervos declanșează eliberarea de acetilcolină urmată de activarea celulelor generatoare de energie electromagnetică în vizibil. Rolul bioluminescenței diferă de la o specie la alta, el reprezentând un semnal cu

semnificație sexuală la licurici, un semnal de vânatoare la peștii luminescenți, un ecran de protecție optică la unele specii de moluște.

Denumirea generică pentru substanța bioluminescentă este *luciferina*, fie că este vorba de o fluorescență - adică o emisie care se produce imediat după acțiunea stimulului, fie că este vorba de o fosforescență - adică o emisie care succede la un interval de timp mai mare după încetarea acțiunii stimulului.

La diferite specii structura acestei substanțe diferă și ea. Formula chimică a luciferinei (Figura 100) din țesutul extern al abdomenului licuriciului este următoarea:

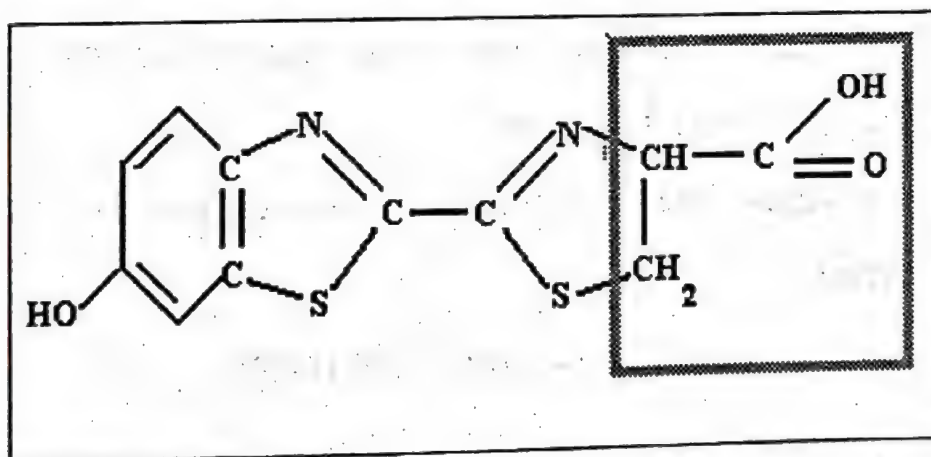


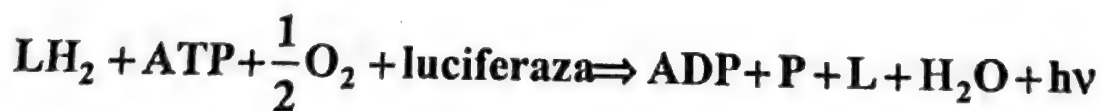
Figura 100. - Structura luciferinei de la licurici. Partea marcată participă efectiv la transformările energetice

Procese chimice pe care le suferă luciferina, sunt legate de oxido - reducerile din organismul respectiv prin care

oxigenul este implicat în mod nemijlocit în bioluminescență. Enzima care controlează transformările luciferinei este denumită generic *luciferază*. Etapele transformării luciferinei pot fi prezentate rezumativ astfel:

- Activarea luciferinei prin interacțiuni cu luciferaza în prezența ATP (acid adenzintrifosforic care înmagazinează energie metabolică) și a ionilor bivalenți de magneziu; se formează complexul luciferină - AMP (acid adenzin monofosforic);
- Oxidarea complexului luciferină - AMP cu formarea unui endoperoxid de luciferină;
- Scindarea endoperoxidului de luciferină în decarboxietoluciferină (în stare energetică excitată de singlet) și bioxid de carbon;
- Dezexcitarea decarboxietoluciferinei cu emisia unui foton în vizibil.

Reacția globală poate fi dată în forma:



unde: LH_2 este luciferina în stare redusă, L este luciferina în stare oxidată, P este o grupare fosforică iar $h\nu$ este cuanta de energie emisă. Schema nivelelor energetice electronice și a tranzițiilor dintre acestea poate fi prezentată ca în Figura 101.

Parametrii fizici ai bioluminescenței vizează: compoziția spectrală, intensitatea emisiei, randamentul emisiei.

Distribuția spectrală a emisiilor bioluminescente variază de la o specie la alta, în cazul licuricilor fiind o emisie în domeniul galben-verzui, în cazul unor specii de pești și moluște fiind o emisie în domeniul roșu iar la unele microorganisme de tipul fungilor fiind o emisie în verde.

*Intensitatea emisiei unei singure bacterii din specia *Bacillus phosphorescens* este evaluată la $1,9 \times 10^{-14}$ cd (candelă, unitate de măsură a intensității luminii în sistemul internațional) iar în cazul unor femele de *Lampyris noctiluca* (licurici) la $1,6 \times 10^{-14}$ cd, ceea ce este suficient pentru impresiunea hârtiei fotosensibile.*

Pentru definirea randamentului chimic al bioluminescenței s-a propus raportarea energiei emise (exprimată în cuante) la numărul de molecule de oxigen consumate. În aceste condiții, o bacterie emite în fiecare secundă o cantă de energie în vizibil și consumă 33 molecule de oxigen în timp ce pentru dezexcitarea fiecărei molecule de luciferină în cazul licuriciului este necesară o singură moleculă de oxigen.

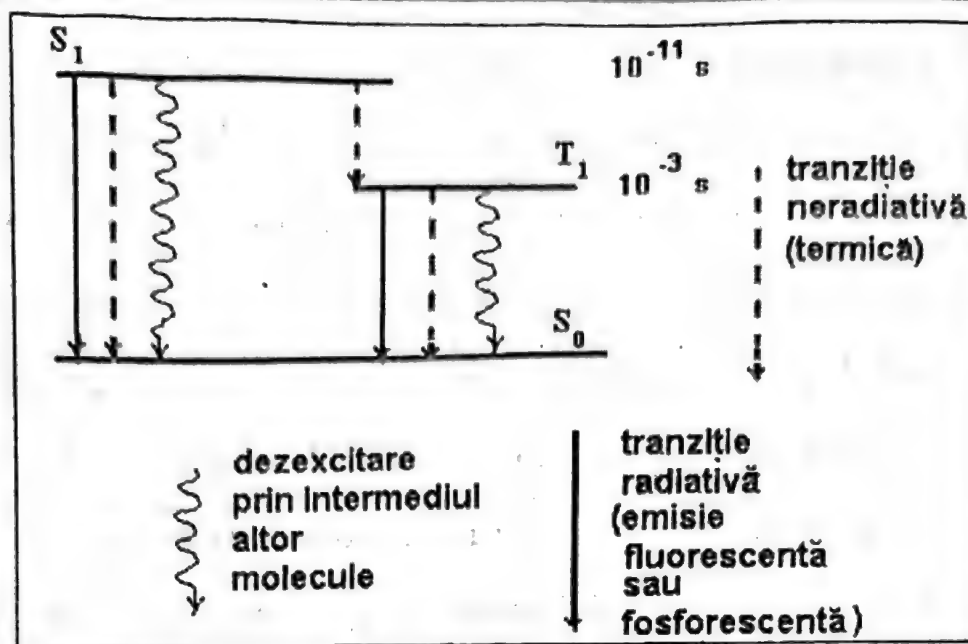


Figura 101. - Tranzițiile energetice între nivelele electronice de singlet (S_1 - S_0) și triplet (T_1 - S_0) din molecula de luciferină (după V. Gheorghiu și A. Popescu 1990).

Multe cercetări au vizat evidențierea luminescenței la proteine și aminoacizi, (Szent - Gyorgyi, Debye și Edwards, Konev, și col., 1972), acest fenomen fiind confirmat în domeniul 450-300 nm și pH apropiat de cel neutru, pentru aminoacizii aromatici (tirozina, triptofanul, fenilalanina) dar și pentru cei alifatici sau sulfurati. Ca și soluțiile de aminoacizi înghețate la temperaturi foarte scăzute (temperatura având o influență semnificativă asupra populațiilor nivelelor electronice moleculare), și proteinele care conțin resturi ale acestor aminoacizi au prezentat fosforescență ca urmare a excitării cu radiații electromagnetice din zona maximelor de absorbție ale triptofanului și tirozinei, în special. Acest tip de luminescență

este o *fotoluminescență*, fiind consecința excitării cu energie luminoasă. La bazele azotate ale acizilor nucleici fluorescența și fosforescența (Tabelul 12) au fost evidențiate în domeniul 310-350 nm, pentru soluții înghețate la temperatura azotului lichid și la valori extreme de pH: acid sau bazic.

Tabelul 12. Lungimile de undă la care bazele azotate prezintă maxime de fotoluminescență (după C. Nicolau și Z. Simon, 1967)

Molecula	pH	Maxim de fluorescență (nm)	Maxim de fosforescență (nm)
Citozină	1 – aciditate maximă	315	400
	7 – neutru	312	
	11 – foarte bazic	340-365	
Timină	7 – neutru	316	435
	11 – foarte bazic	320	
Uracil	7 – neutru	315	410
	11 – foarte bazic	350	
Adenină	1 – aciditate maximă	219, 303, 312, 325	375, 398, 418
	7 – neutru	284, 294, 307, 318	365, 384, 404,
	11 – foarte bazic		425
Guanină	1 – aciditate maximă	215	385, 405, 425
	7 – neutru	320	360, 380, 409,
	11 – foarte bazic	322	417 408

În subcapitolul dedicat clorofilei se poate vedea că fluorescența și fosforescența sunt proprietăți fizice notabile ale acestui tip de molecule.

Prin utilizarea unor fotomultiplicatori de mare sensibilitate s-a evidențiat faptul că, marea majoritate a țesuturilor vii prezintă emisii luminescente de foarte mică intensitate: semințele, rădăcinile, frunzele tuturor speciilor de plante, celulele creierului, ficatului, pielii la toate speciile de mamifere. Aceste emisii de foarte mică intensitate se presupun a fi legate de necesitatea eliminării unui excedent de energie care se cere eliberată imediat ce reacțiile metabolice furnizează mai multă energie decât este necesar pentru echilibrul energetic. Deci, această ipoteză consideră că bioluminescența, dacă nu are un rol indispensabil în adaptarea și reglarea organismului, atunci reprezintă o supapă de siguranță ceea ce se consideră, de asemenea, o funcție indispensabilă vieții.

15.6. Elemente de biofizica pigmentilor fotosensibili

Rodopsina este denumirea generică pentru o clasă întreagă de pigmenți fotosensibili - molecule proteice de tipul cromoproteinelor care sunt alcătuite dintr-o parte proteică masivă - *opsina* și un cromofor - *retinalul*. Localizarea celulară

a acestor pigmenți este la nivelul membranei celulare (Figura 102).

La vertebrate, celulele fotoreceptoare conțin niște formațiuni specializate în depozitarea rodopsinei și anume discurile din segmentul extern al bastonașelor sau conurilor (Figura 103).

Diferențele dintre molecule de tipul rodopsinei constau atât în deosebiri structurale la nivelul opsinei, cât și al cromoforului. Astfel, la celulele fotoreceptoare numite *bastonașe*, rodopsina este caracterizată de o curbă de absorbție

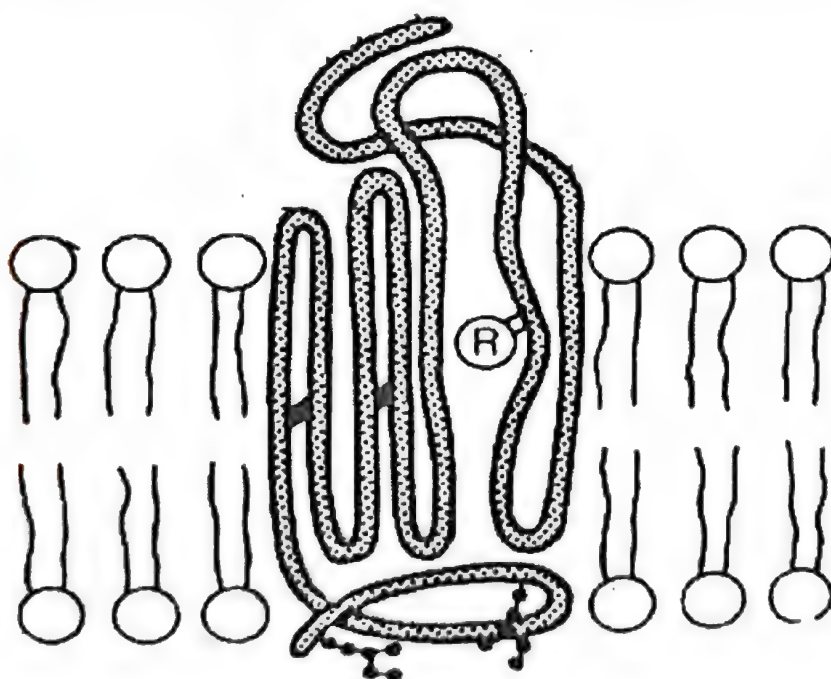


Figura 102. - Asamblarea rodopsinei în membrana discurilor din celulele fotoreceptoare ale vertebratelor (poziția retinalului R - nu este suficient de bine precizată) (după W. Hope și col. 1983)

ce diferă de cele ale rodopsinelor celulelor tip de fotoreceptori, *conurile* (trei tipuri principale de rodopsine). De asemenea, la nevertebratele cu sistem vizual foarte dezvoltat (insecte diurne numite diptere), se întâlnesc diferite tipuri de pigment fotosensibil, numit *xantopsină* (după numele precursorilor săi xantofilici).

În toate cazurile numai pigmentul rodopsinei absoarbe radiația luminoasă din vizibil și chiar din ultraviolet la unele specii de nevertebrate (Figura 104) care suferă apoi o serie de modificări conformaționale care se traduc în final în modificări de permeabilitate a membranei celulare pentru diferite tipuri de ioni mici.

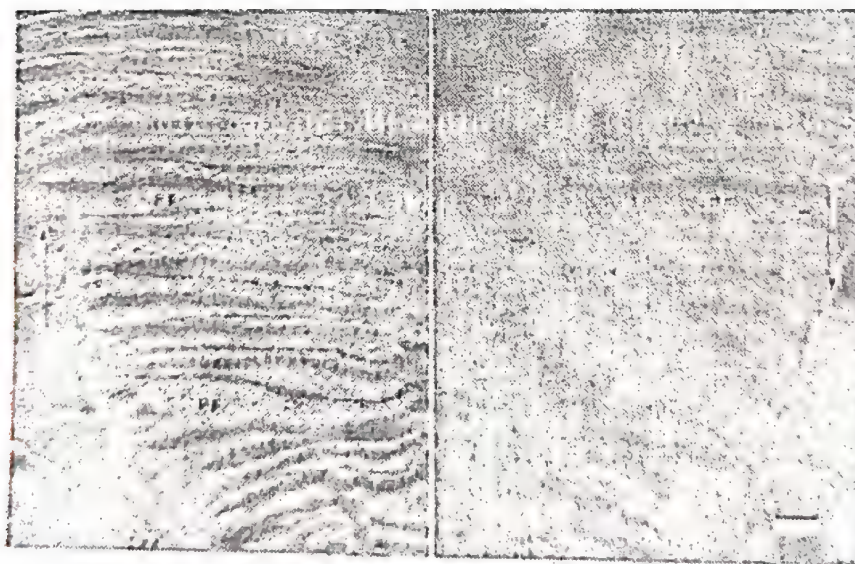
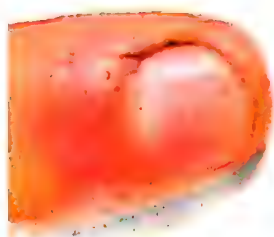


Figura 103. - Imagine obținută la microscopul electronic relevând formațiunile de natură membranoasă (discurile) din celulele fotoreceptoare ale vertebratelor (W. Hope și col. 1983)

Principala modificare conformațională este considerată cea de trecere a cromoforului de la forma *cis* la forma *trans* (Figura 105).

Într-un model al transformărilor chimice ale rodopsinei, elaborat de Hendrichs (Figura 106), după această etapă a efectului fotochimic urmează alte transformări care duc la lumirodopsină, metarodopsină și în final la desprinderea transretinalului de partea proteică (ceea ce nu se întâmplă și la xantopsina nevertebratelor).

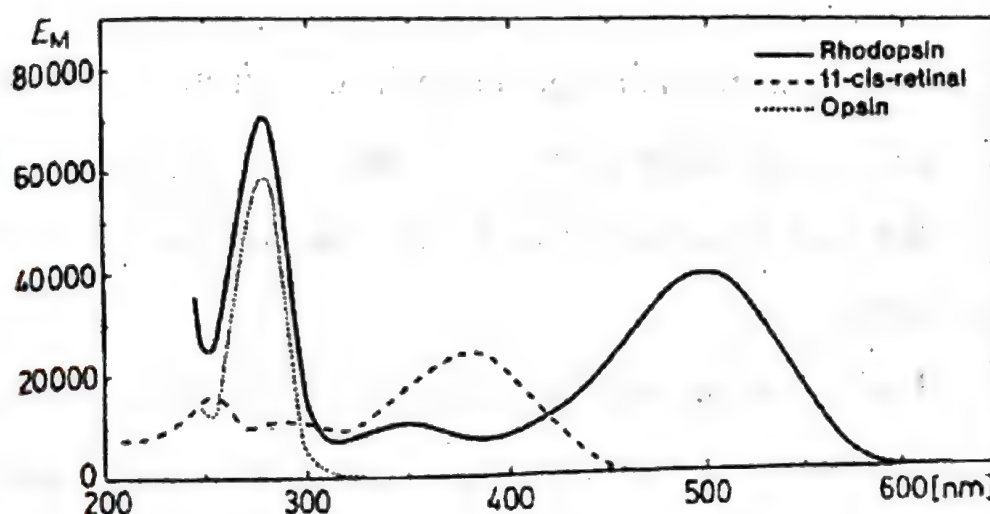


Figura 104. - Spectrele de absorbție ale rodopsinei, 11-cis retinalului și opsinei în domeniul de la 200 nm la 600 nm lungime de undă (modificat după W. Hope și col.)

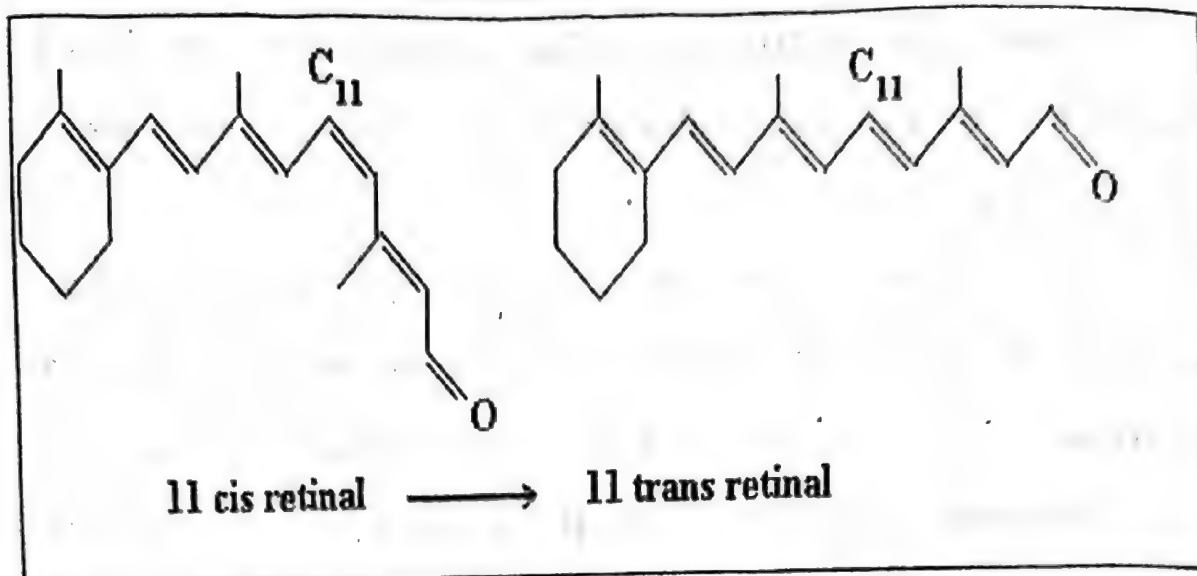


Figura 105. - Transformarea conformațională a retinalului după absorbția luminii (după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Structurile retiniene generate în cadrul acestei suite de transformări sunt caracterizate de maxime de absorbție la diferite lungimi de undă și evidențiate experimental la diferite temperaturi.

Rodopsina se poate reface pe două căi una rapidă și alta lentă, după cum descompunerea s-a realizat numai până la *retinal* sau până la *retinol* (vitamina A), ceea ce poate să explice diferența în viteza de adaptare de la obscuritate la iluminare a ochiului.

Pigmentul fotosensibil din bastonașe (rodopsina denumită și purpur retinian) are o curbă de absorbție $A(\lambda)$ (Figura 107) care coincide practic cu cea a sensibilității

ochiului în lumină de slabă intensitate (vederea scotopică)(Figura 108).

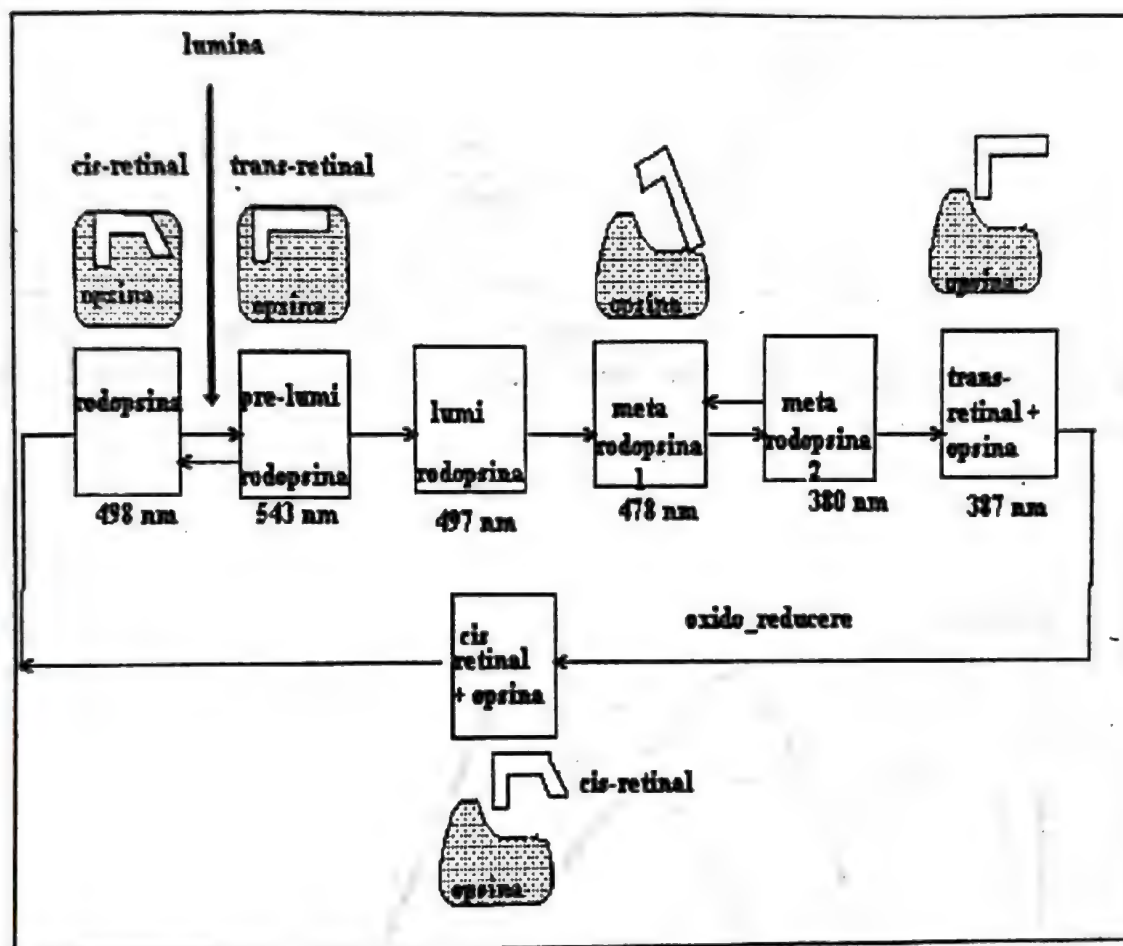


Figura 106. - Schema propusă de Hendrichs pentru ciclul de transformări reversibile ale rodopsinei (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

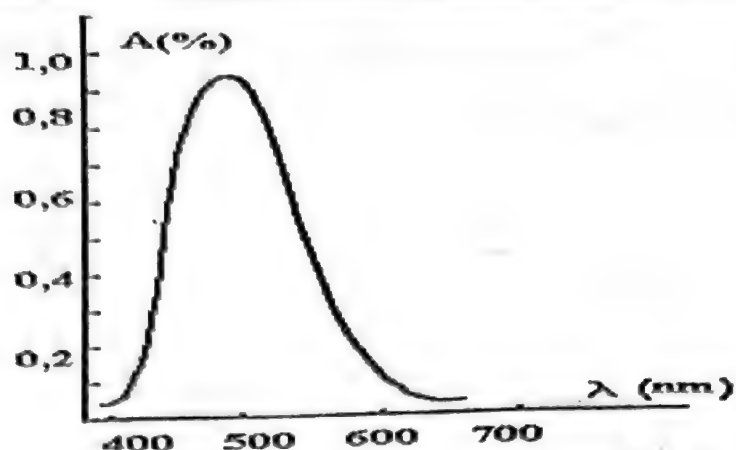


Figura 107. - Curba de absorbție în vizibil a rodopsinei din celulele vizuale de tipul bastonașelor prezintă un maxim care coincide practic cu cel al curbei de sensibilitate vizuală în lumină albă de slabă intensitate (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

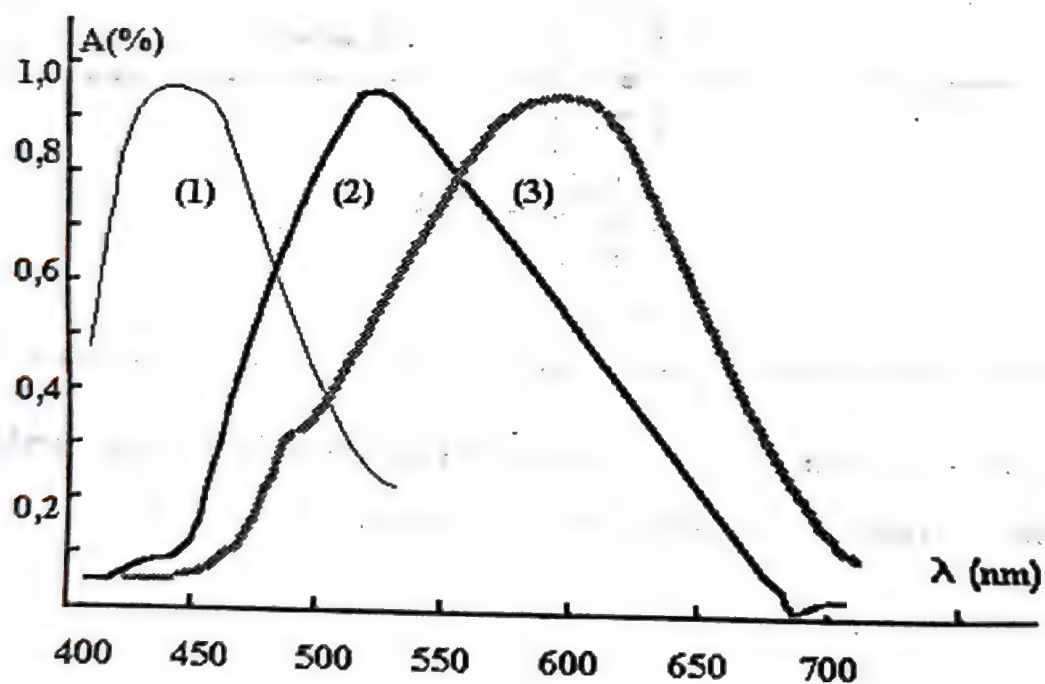


Figura 108. - Curbele de absorbție ale pigmentilor fotosensibili din celulele fotoreceptoare de tipul conurilor (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Mecanismele prin care transformările suferite de pigmenții fotosensibili duc la activarea unor canale ionice și la modificarea permeabilității membranare pentru fluxurile de ioni nu sunt suficient de bine cunoscute.

Consecințele sunt nemijlocit legate de fenomenul de bioelectrogeneză în celulele fotoreceptoare și apoi în celulele neuronale ce fac sinapsă cu fotoreceptorii și realizează transducția semnalului luminos în impuls nervos capabil să se propage la centrii nervoși corespunzători din sistemul nervos central.

CAPITOLUL 16

Biofizica fotorecepției celulare

Celula fotoreceptoare este unul din principalele tipuri de celule excitabile din organism, iar țesutul retinian căruia îi aparține face parte din unul dintre cele mai importante sisteme senzoriale.

La vertebrate și la numeroase nevertebrate de altfel, sistemul vizual este unul dintre cele mai dezvoltate asigurând receptarea a peste 90 % din informația provenită din mediul înconjurător.



16.1. Structura celulei fotoreceptoare

Retina vertebratelor prezintă două feluri de celule fotoreceptoare, cu bastonașe și cu conuri (Figura 109) care diferă prin structura și funcțiile îndeplinite, dar care, în esență funcționează pe baza aceluiasi fenomen - fototransducția. Cu toate că energia stimulului luminos absorbit este foarte mică (poate fi vorba chiar de un singur foton) totuși celulele

fotoreceptoare funcționează ca niște amplificatoare (de până la 10^6 ori) în baza energiei furnizată de celulă.

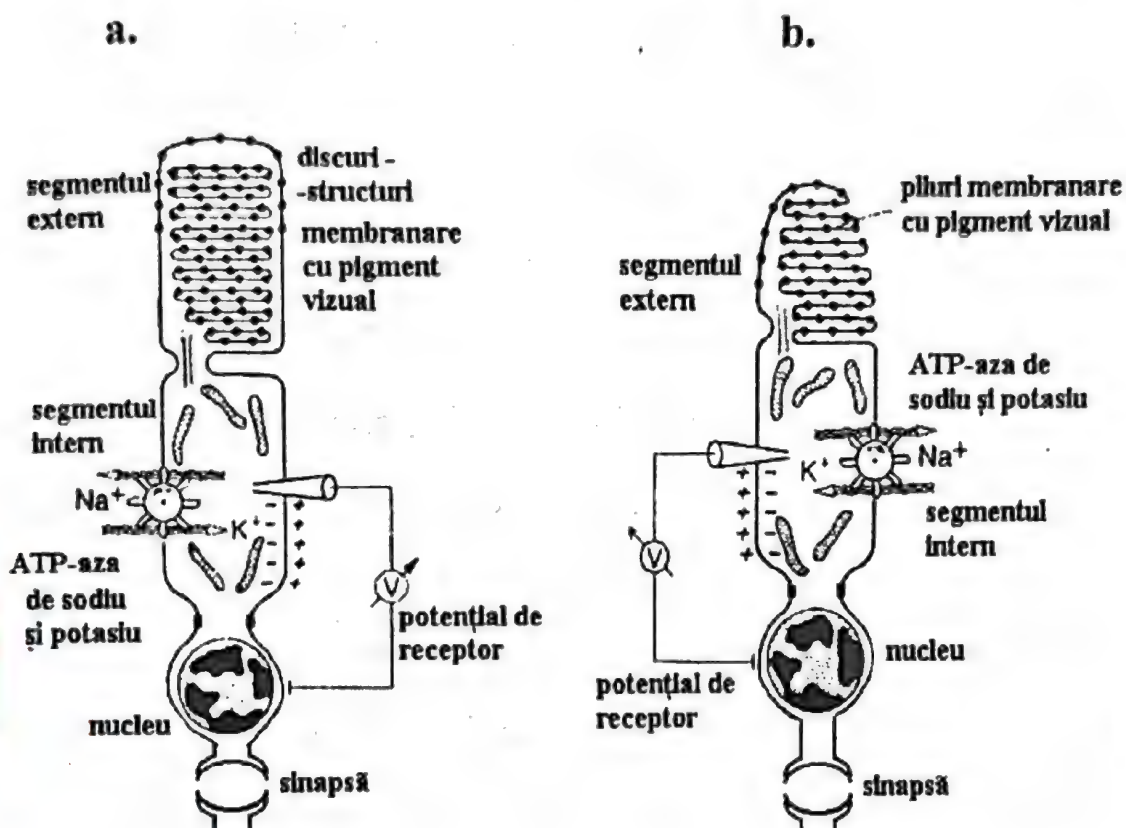


Figura 109. a - Celulă fotoreceptoare de tip bastonaș, caracteristică vertebratelor cu lungime de circa 80 micrometri dintre care 30-40 micrometri revin segmentului extern. b - Celulă fotoreceptoare de tip con, caracteristică vertebratelor (W. Hope și col. 1983)

Bastonașele și conurile de la vertebrate sunt celule care prezintă un segment extern, caracterizat de sute sau chiar mii de pliuri ale membranei celulare în care densitatea de molecule de pigment vizual este considerabilă.

Metabolismul celular se desfășoară la nivelul segmentului intern unde se găsește un număr mare de

mitocondrii și aparatul Golgi care este de asemenea foarte bine reprezentat.

La bastonașe pliurile sunt complet desprinse de plasmalemă constituind așa numitele discuri - structural asemănătoare cloroplastelor din celulele plantelor superioare.

În cazul fotoreceptorilor nevertebratelor, aceste pliuri sunt aranjate lateral față de corpul celulei (Figura 110) și se prezintă sub forma unor cili (microvili) constituind așa numitul rabdomer. Înțelegerea multor aspecte ale funcționării aparatului vizual la vertebrate (și implicit la om - obiectivul cel mai înalt al cercetărilor întreprinse în cadrul tuturor ramurilor științelor naturii) a fost facilitată de studiul comparativ al sistemului vizual la diversele specii de viețuitoare de pe scara evolutivă și în special, este vorba de nevertebratele superioare cum sunt artropodele și insectele.

În toate situațiile, membrana bogată în molecule de rodopsină, este compusă din circa 50% proteine, dintre care unele cu activitate enzimatică (ATP-aze, GTP-aze), circa 45 % lipide (fosfatidilcolină, fosfatidiletolamină) și câteva procente de colesterol. Dintre proteine circa 30 % sunt hidrosolubile, iar cele insolubile în apă 80-90% sunt molecule de rodopsină (prezentate într-un alt capitol în care am evidențiat existența

diferitelor tipuri de rodopsină, atât în fotoreceptorii vertebratelor cât și a nevertebratelor - xantopsina).

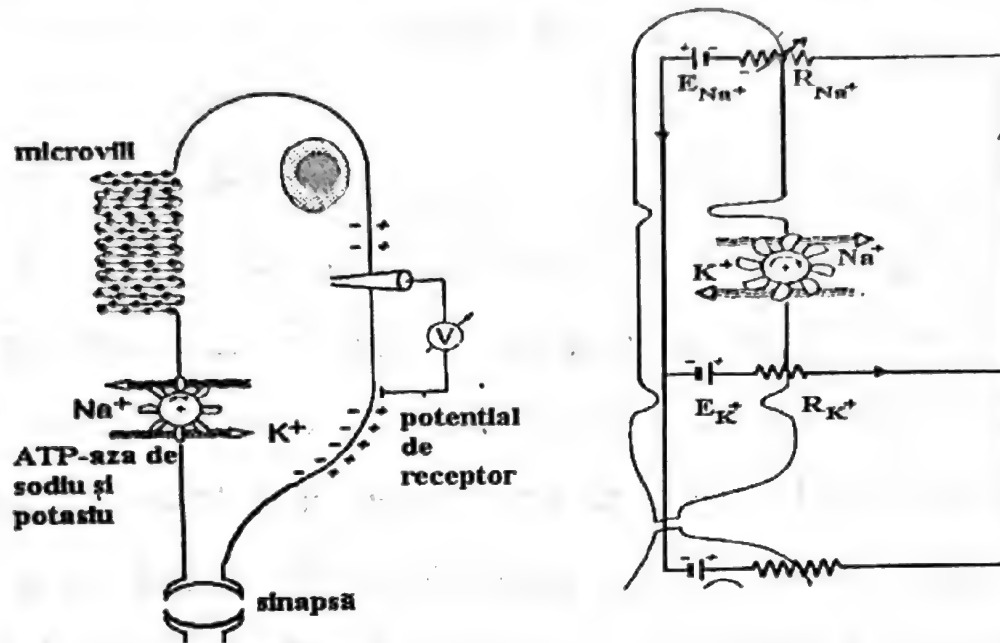


Figura 110. a - celula fotoreceptoare la nevertebrate (lungime de circa 200 microni); b - curenții ionici dintr-o celulă bastonaș de la vertebrate. Membrana segmentului intern este mai permeabilă pentru potasiu (extruzie masivă, inclusiv la nivelul sinapsei) în timp ce membrana segmentului extern este mai permeabilă pentru sodiu (intruzie puternică) (W. Hope și col. 1983)

16.2. Structura retinei

Ansamblul celulelor fotoreceptoare de la vertebrate formează un țesut continuu, *retina*, în cadrul căruia însă distribuția bastonașelor și a conurilor nu este uniformă.

Conurile prezintă o mare densitate în regiunea centrală și ocupă în exclusivitate zona mijlocie a acestei regiuni - fovea centralis.

Bastonașele au o densitate din ce în ce mai mare de la marginile regiunii centrale către zonele periferice ale retinei unde conurile dispar cu totul (Haulică I. și Topoliceanu F., 1999).

La nevertebratele superioare, ansamblul celulelor fotoreceptoare formează o *retinulă* care este caracterizată de o structură discontinuă, deoarece ochiul acestor viețuitoare, este un ochi compus din multe sute și chiar mii de ochi elementari numite omatidii. Un astfel de ochi elementar este alcătuit cel mai adesea din opt celule fotoreceptoare ($R_1 - R_8$). El este acoperit de un cristalin și o corneă, astfel că aspectul de ansamblu al ochiului compus este cel al unui ochi fațetat. Cele opt celule fotoreceptoare nu sunt identice, dar cele șase de la periferia omatidiei au sensibilitate sporită pentru lungimi de undă mici și intensități luminoase mici, în timp ce cuplul de fotoreceptori centrali, suprapuși, prezintă sensibilitate sporită pentru radiația luminoasă cu lungimi de undă mai mari și fluxuri cu intensități relativ mari. Aceste două celule nu sunt identice nici din punctul de vedere al sensibilităților spectrale ale fotoreceptorilor și nici pe toată suprafața ochiului compus. De exemplu, la multe specii de insecte de tipul dipterelor (ex.: *Drosophila melanogaster*), există două populații de celule fotoreceptoare centrale, care apar distincte la microscopul cu

fluorescență. La unele specii de diptere, ochii prezintă un dimorfism sexual, astfel că masculul prezintă în plus față de femelă, o zonă a ochiului în care celulele fotoreceptoare prezintă o colorație specială și o sensibilitate spectrală care include într-un al treilea tip de populații de fotoreceptori.

La vertebrate celulele din retină fac sinapsă cu celule bipolare (*bipolare propriu-zise, orizontale și amacrine*), iar acestea în continuare cu celulele multipolare (*ganglionare*).

La nevertebrate celulele din retinulă fac sinapsă cu celulele din primul ganglion optic (*lamina*) cu excepția celor două centrale. Celulele din lamina ca și cele două celule centrale fotoreceptoare din fiecare omatidie fac sinapsă în ganglionul de ordinul doi (*medula*), care este urmat de cel de-al treilea ganglion optic - *lobula*.

16.3. Cuplarea transformărilor rodopsinei cu modificările potențialului de membrană

Mecanismul cuplării reacțiilor biochimice suferite de rodopsină cu modificările de potențial electric ale membranei celulei fotoreceptoare este în mare măsură insuficient cunoscut până acum, dar este plauzibil ca transformările

conformaționale ale rodopsinei să determine modificări ale *momentului dipolar electric* al acestei molecule.

Câmpul electric modificat al acestui dipol poate fi în mod direct sau mai probabil, indirect, elementul care duce la declanșarea activării unor canale ionice din membrana fotoreceptoare și, ca urmare a schimbărilor de permeabilitate ale membranei pentru diferiți cationi. De aici, rezultă și variația potențialului electric de membrană respectiv apariția potențialului de acțiune - potențialul de receptor.

La vertebrate, în lipsa stimulului luminos, potențialul electric de membrană (potențial de repaus - de întuneric) este în principal un potențial de difuzie, de altfel ca și la nevertebrate. Există o permanentă diferență între valorile potențialului de repaus de la nivelul segmentului extern și al celui intern al celulei fotoreceptoare (*potențialul de membrană este mai mare pentru segmentul intern decât pentru cel extern*). De aceea, este semnalată o permanentă circulație a ionilor de sodiu și potasiu (curent ionic de membrană) după cum se arată și în Figura 110.

După absorbția luminii în moleculele de rodopsină permeabilitatea membranei scade (în primul rând *scade permeabilitatea membranei segmentului extern pentru sodiu*) și imediat scade și curentul ionic transmembranar, ceea ce duce în

final, la o hiperpolarizare a membranei - potențialul de acțiune este mai mare decât la întuneric.

Ionii de calciu sunt susceptibili de a juca un rol important în cuplarea transformărilor rodopsinei - localizată la nivelul discurilor, fără contact direct cu membrana celulară - cu controlul unor canale ionice membranare. Dacă este așa, atunci ionii de calciu, eliberați ca urmare a acțiunii luminii asupra rodopsinei, ar fi cei care determină inactivarea unor canale de sodiu (Haulică I. și Topoliceanu F., 1999).

Unele cercetări experimentale arată că modificările rodopsinei, determină activarea unei enzime de tip fosfodiesterază care determină o scădere a concentrației citoplasmăice de *guanozin monofosfat ciclic (cGMP)* care, la rândul său ar determina blocarea canalelor de sodiu.

La nevertebrate, în lipsa stimulului luminos, membrana fotoreceptorilor prezintă o mare permeabilitate față de potasiu (canale ionice "de întuneric") care este principalul responsabil de potențialul de întuneric. Absorbția luminii determină o *creștere a permeabilității membranare pentru sodiu* ceea ce va duce în final la o depolarizare a membranei.

Rolul *ionilor de calciu* este presupus a fi foarte important și în acest caz. La întuneric ei ar putea bloca canalele de sodiu (unii autori le numesc chiar canale "de lumină")

deoarece sunt activate de absorbția luminii). Absorbția luminii ar putea determina o creștere a afinității feței externe a membranei pentru sodiu și o descreștere simultană a afinității pentru calciu. Repolarizarea este asigurată de creșterea ulterioară a permeabilității pentru potasiu.

O altă ipoteză formulată în legătură cu mesagerii fototransducției la nevertebrate se referă la rolul *cGMP*-ului. Unele cercetări au arătat că se pot activa canale ionice sensibile la lumină prin creșterea concentrației de *cGMP* (A. Richardson și C. W. Taylor 1993, citați de R. C Hardie și B. Minke), iar prin utilizarea unor compuși farmaceutici capabili să afecteze metabolismul nucleotidelor ciclice se poate influența răspunsul fotoreceptorilor la lumină. Interpretarea care s-a dat acestor fapte constă în a admite că există unele canale ionice sensibile la lumină și cu poartă controlată de nucleotidele ciclice și blocată de unii ioni bivalenți.

Constatarea că în cazul *Drosophilei melanogaster* canalele sensibile la lumină sunt în mod particular permeabile pentru calciu, se poate corela cu un fenomen evidențiat la multe tipuri de celule neexcitabile de la vertebrate. Este vorba de faptul că *activarea transformărilor fosfoinozitudelor* este asociată și cu deschiderea canalelor de calciu din membrana celulară iar influxul de calciu care se produce determină

reumplerea depozitelor intracelulare și menține răspunsul fiziologic. Dar activarea acestui mecanism este încă incomplet clarificată și singurul model fenomenologic ce aduce unele certitudini este cel numit *intruzia capacitativă a calciului*.

Conform acestui model, semnalul determinant al excitației, nu este creșterea calciului intracelular, ci epuizarea rezervelor de calciu din cisternele intracelulare sensibile la *inozitoltrifosfat* (IP_3). Acest model a fost elaborat, ca urmare a datelor experimentale obținute din teste bazate, pe introducerea ionoforetică a calciului în celulă și blocarea pompelor de calciu din membranele depozitelor intracelulare. Dar chiar și în ipoteza veridicității acestui model nu se poate elucidă total mecanismul fototransducției la nevertebrate și mai ales rămîne deschisă o problemă ridicată de multă vreme și anume modul în care eliberarea calciului din depozitele submicrovilare duce la transmiterea semnalului la nivelul membranei celulare.

O explicație ar putea fi legată de existența unui alt mesager difuzibil, așa numitul *factor de influx al calciului* (CIF) (C. Randrimampita și R. Y. Tsien 1993, citați de R. Hardie și B. Minke). O altă explicație, mai radicală, este bazată

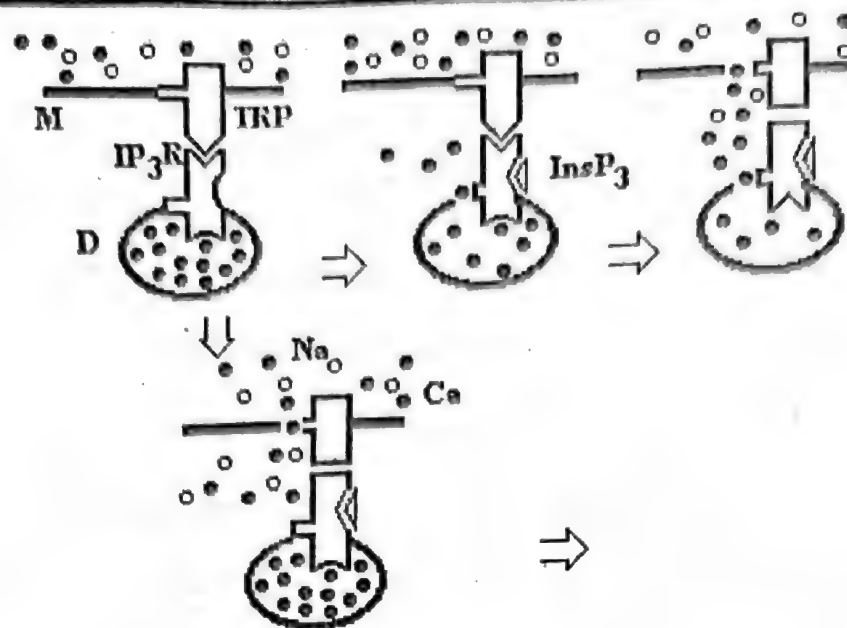


Figura 111. - Modelul de cuplare conformațională a intruziei capacitative a calciului. Canalul de intrare a calciului din mediul extracelular prin membrana celulară, M, este proteina TRP controlată de gena *trp*. Acest canal este cuplat la membrana depozitului intracelular submicrovilar, D, prin interacțiune directă cu receptorul IP₃R pentru inozitoltrifosfat, IP₃, aflat în membrana depozitului. Controlul porții canalului se realizează prin intermediul schimbărilor conformaționale ale receptorului pentru inozitoltrifosfat. Astfel, inozitoltrifosfatul declanșează eliberarea calciului intracelular și golirea depozitelor submicrovilare. Un situs de legare a calciului situat la terminalul receptorului pentru inozitoltrifosfat sesizează diminuarea concentrației de calciu din depozit și determină a modificare conformațională a canalului de calciu din membrana celulară ceea ce duce la intruzia calciului extracelular sau, direct IP₃ determină intruzia calciului în celulă (modificat după R. C. Hardie 1994)

pe ideea, că în membrana celulară există canale de calciu (proteinele TRP) legate de receptorii pentru inozitoltrifosfat (Figura 111) din membranele microvilare cu care interacționează și de către care sunt controlate, iar situsurile de

legare a calciului la receptorul pentru inozitoltrifosfat pot acționa ca senzori pentru calciul din depozite.

Se poate sublinia că potențialul genetic deosebit al *Drosophilei melanogaster* a constituit un punct de bază în studiile menite să precizeze mecanismele transformărilor fosfoinozitidelor implicate în fototransducția de la diptere. Astfel, gena *trp* ar fi cea care controlează o categorie de canale de calciu reglate de fosfoinozitide și descoperirea recentă a unor gene analoage în creierul șoarecelui (C. H. Petersen et al., 1995,) pot susține unele analogii cu mecanismele de reglare mediate de aceste substanțe la vertebrate.

16.4. Potențiale de acțiune și curenți ionici de excitație

Înregistrări ale potențialelor de membrană s-au efectuat preponderent la nevertebrate, care prezintă celulele fotoreceptoare de dimensiuni mult mai mari decât vertebratele (cu tehnica sugerată în Figurile 109 și 110, bazată pe introducerea unui microelectrod în interiorul celulei) și, dintre vertebrate, la câteva specii de pești care prezintă celule fotoreceptoare considerabil mai mari decât la alte vertebrate.

Înregistrări ale curenților transmembranari (Figura 112) au fost efectuate prin metoda potențialului fixat sau prin sucția

unei celule într-un electrod adecvat, reușindu-se a se evidenția variația intensității curentului ca urmare a iluminării, atât la celulele fotoreceptoare de la vertebrate (D.A. Baylor și col. 1979) (citată de W. Hope și col 1983.) cât și de la nevertebrate.

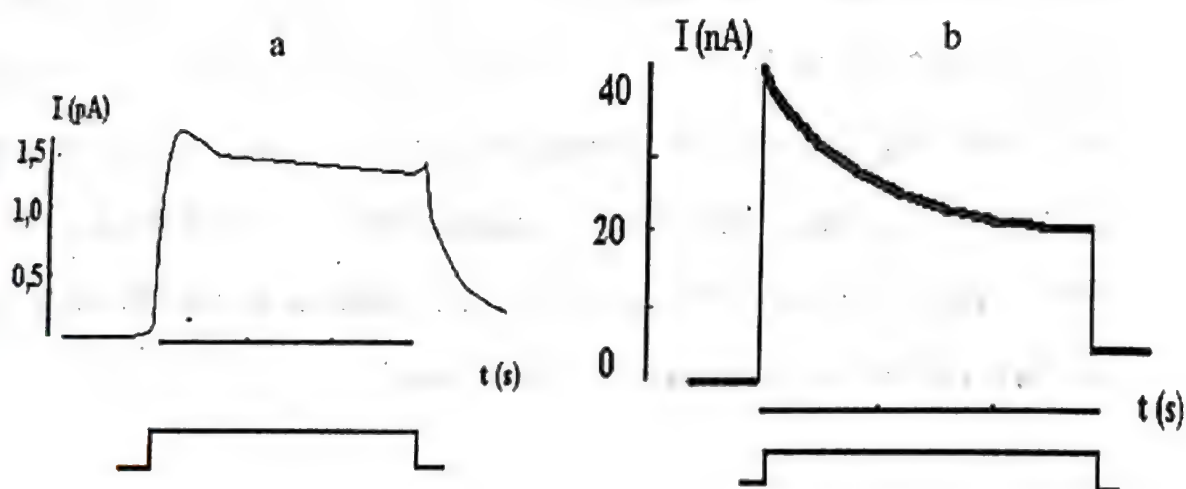


Figura 112. a - Curentul ionic transmembranar înregistrat folosind un electrod de sucție la celulă cu bastonaș. b - Curent ionic transmembranar înregistrat la potențial fixat, de valoare pozitivă, la nevertebrate (după W. Hope și col. 1983). Este reprezentat și stimulul luminos, în partea de jos a figurii.

De asemenea, au fost studiate prin aceste tehnici și potențialele de acțiune de la nivelul celulelor bipolare propriu-zis, orizontale și amacrine (hiperpolarizări) și ganglionare (depolarizări) din retina vertebratelor precum și la nivelul celulelor din primul ganglion optic, lamina, de la nevertebrate

(unde, spre deosebire de fotoreceptori, se produce o hiperpolarizare).

Informații globale asupra bioelectrogenezei ochiului se pot obține din înregistrări extracorneene de potențial electric cu electrozi de suprafață - înregistrări electroretinografice (ERG). În Figurile 113, 114 și 115 sunt date răspunsurile extracorneene față de stimulii luminoși rectangulari, atât la vertebrate (om) cât și la nevertebrate (*Drosophila melanogaster*).

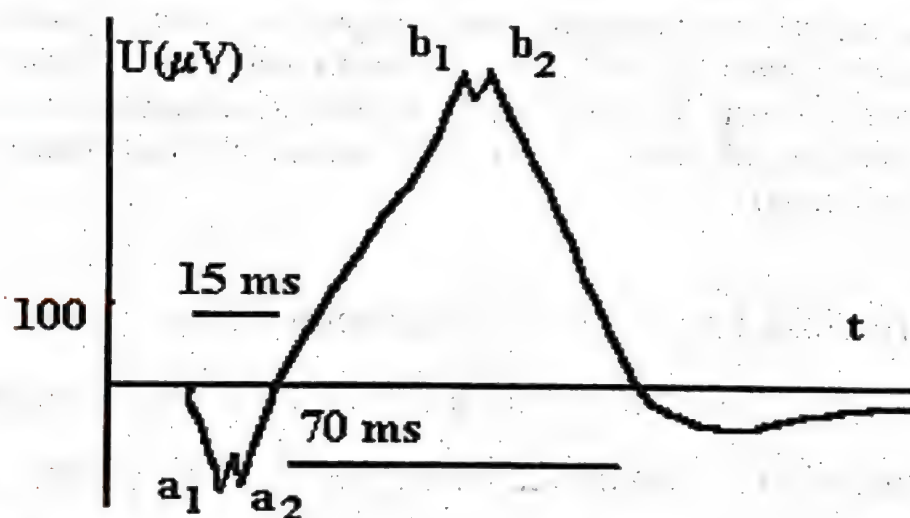


Figura 113. - Electroretinograma umană pentru stimul luminos unic cu durata de 0,1 secunde. Undele a_1 și a_2 apar ca niște deflexiuni negative față de potențialul de repaus al corneei (pozitiv) în timp ce undele b_1 și b_2 apar ca niște unde pozitive. Amplitudinea nu depășește 1 mV (după F. Gremy 1982).

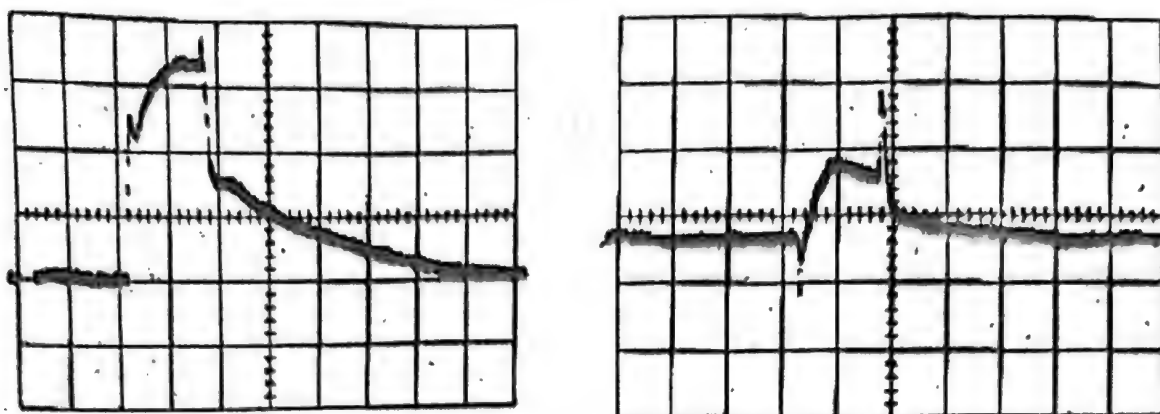


Figura 114.- Electoretinograma obținută la *Drosophila melanogaster* pentru stimul luminos unic, cu durată de 1 secundă (stânga - intensitate luminoasă mare, de circa 10^{-5} mW/m^2 -se observă două componente tranzitorii de depolarizare alături de potențialul de receptor; dreapta - intensitate luminoasă mică de circa 10^{-7} mW/m^2 - se observă componenta tranzitorie de hiperpolarizare și numai ultima din cele două tranzitorii de depolarizare)
1 div. = 5 mV (pe ordonată) și 1 div. = 10 ms (pe abscisă) (înregistrare proprie pe osciloscop)

Atribuirea originilor componentelor ERG la vertebrate este încă o problemă discutabilă, deși cei mai mulți dintre autori sunt de acord cu faptul că celulele fotoreceptoare sunt responsabile de componentele a_1 - a_2 , iar celulele bipolare sunt responsabile de componentele b_1 - b_2 .

La vertebrate componentele tranzitorii, foarte rapide, sunt legate de bioelectrogenza din celulele ganglionului optic lamina (hiperpolarizarea este atribuită unei creșteri a conductanței pentru clor iar depolarizările se atribuie creșterilor

de conductanță pentru sodiu sau calciu). Potențialul de receptor este atribuit în principal celulelor fotoreceptoare.

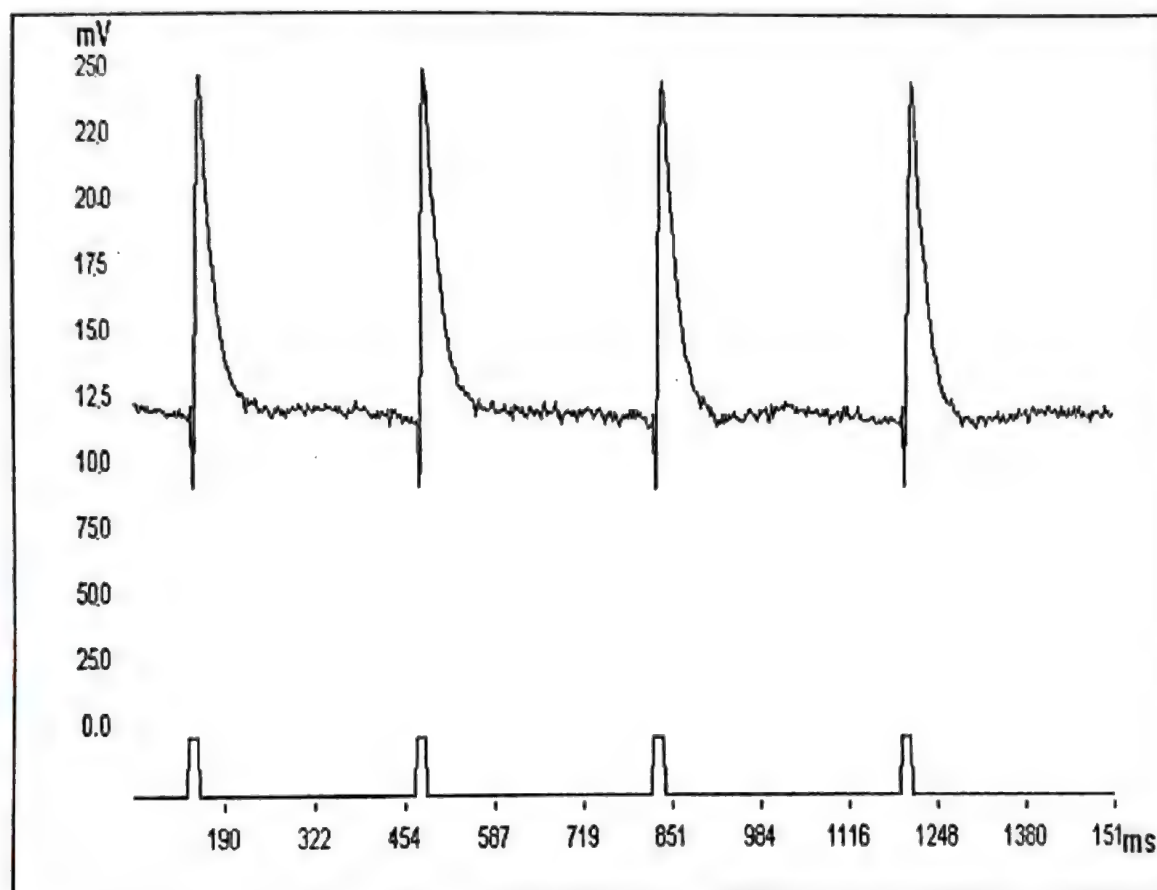


Figura 115. - Achiziție computerizată de semnal ERG obținut la *Drosophila melanogaster* pentru excitare luminoasă în regim de stimuli identici (intensitatea de 10^{-5} mW/m²) repetați cu o frecvență de 8 Hz (înregistrare proprie). Componenta de hiperpolarizare este stabilizată dar structura tripartită a semnalului de depolarizare nu mai este discernabilă. În partea de jos a figurii se vede stimulul luminos (înregistrare proprie)

Cercetările asupra influenței parametrilor de iluminare (intensitate, compoziție spectrală, frecvență de aplicare a stimulilor) asupra amplitudinilor răspunsului ERG al

Drosophilei melanogaster au preocupat și pe autorii acestei lucrări (M. Isac și col. 1997; D. E. Creangă și col. 1997; D. E. Creangă 1998; J. C. Sprott și col. 1999; D. E. Creangă, V. V. Morariu și col. 1998).

CAPITOLUL 17

Elemente de biofizică auditivă

17.1. Structura și funcțiile celulelor ciliate din urechea internă

Celulele ciliate din urechea internă sunt celulele receptoare ale semnalului acustic, pe care sunt capabile să îl transforme în semnal electric. Ele se găsesc dispuse în trei rânduri paralele la exteriorul canalului spiralat al organului lui Corti din cohlee (*celule ciliate externe*) și într-un rând la interiorul acestuia (*celule ciliate interne*). Acest canal spiralat se află plasat între două membrane, *membrana bazilară* pe care se sprijină și *membrana tectoria* aflată deasupra sa.

Celulele ciliate sunt prevăzute cu niște *stereocili* și un *kinocil* (care la mamifere se resoarbe în faza embrionară) care pătrund în membrana tectoria.

Semnalul acustic (unda sonoră) este generatorul unei presiuni mecanice care acționează asupra membranei bazilare determinând o deplasare a acesteia față de membrana tectoria. Există câteva deosebiri morfologice între cele două tipuri de

celule ciliate. Cele externe sunt mai subțiri, alungite și nu sunt înconjurate strâns de multe celule suport (Figura 116).

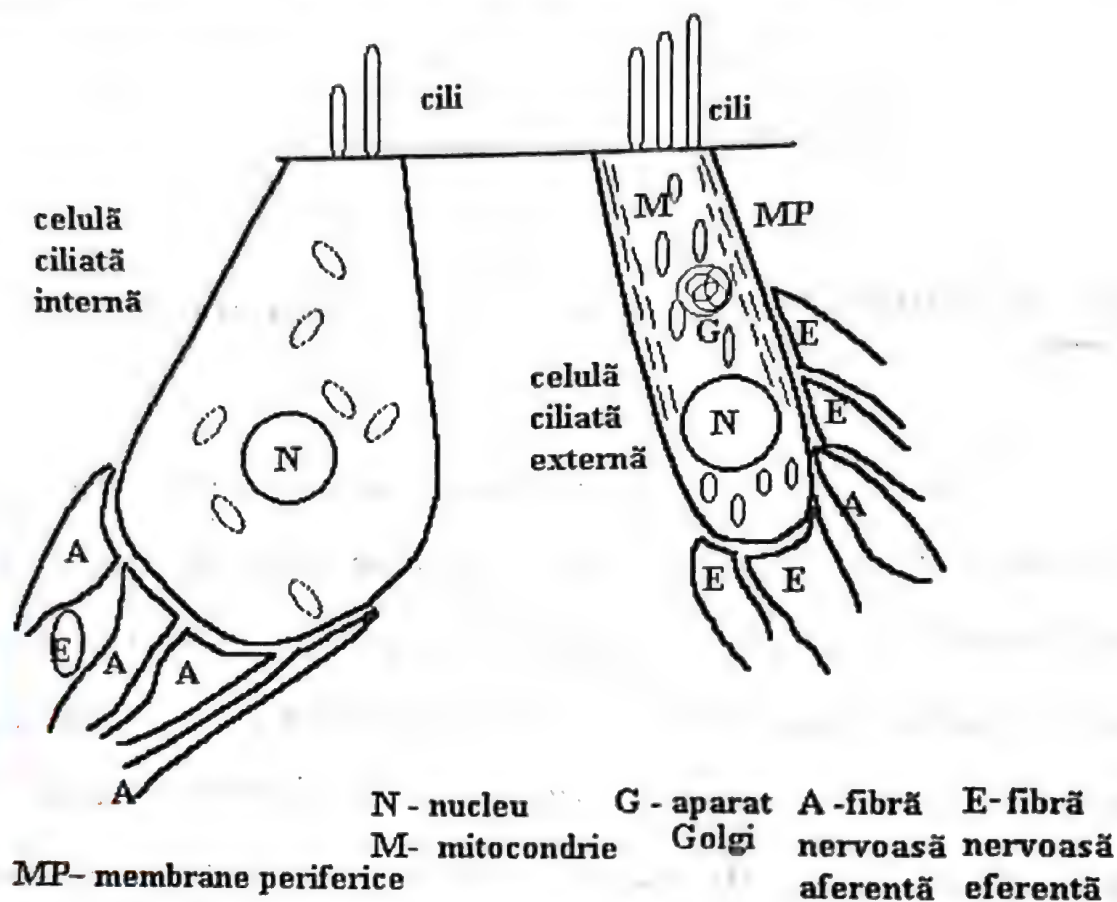


Figura 116. - Structura celulei ciliate interne și celulei ciliate externe (modificat după W. Hope și col. 1983)

Există și deosebiri ultrastructurale între cele două tipuri de celule și, în plus, sinapsele aferente celulelor interne sunt sinapse chimice obișnuite spre deosebire de sinapsele celulelor externe, ceea ce sugerează că aceste două tipuri de celule pot avea funcții diferite.

Majoritatea celulelor nervoase aferente (circa 90%) fac sinapsă cu celulele ciliate interne, fiecare dintre acestea fiind conectată cu câte 20 astfel de fibre nervoase aferente. Fibrele nervoase aferente celulelor ciliate externe nu ajung la creier, ci la ganglionul spiral al cohleei, ceea ce ar putea sugera (din punct de vedere evoluționist), că această inervație a celulelor ciliate externe este în curs de degenerare (Figura 117). Este posibil ca celulele ciliate externe să aibă o funcție localizată la nivelul organului lui Corti adică să influențeze, direct sau indirect, pe cele interne care transmit informația la creier.

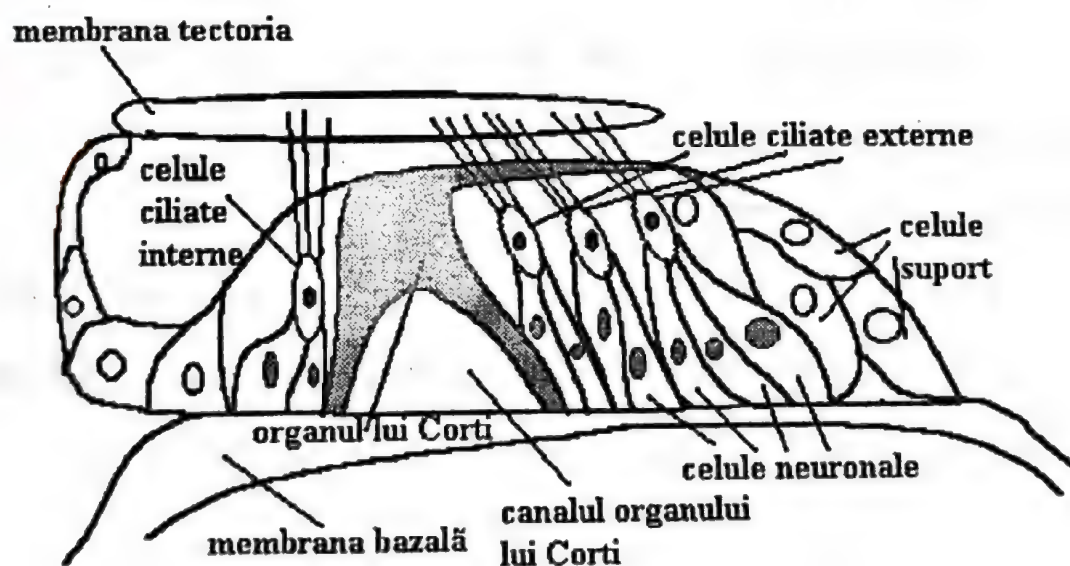


Figura 117. - Reprezentare schematică a dispunerii relative a celulelor ciliate și celor două membrane, membrana bazilară și membrana tectoria (modificat după V. Gheorghe și A. Popescu 1990)

Există dovezi experimentale, că celulele nervoase eferente care fac sinapsă în celulele ciliate externe pot cauza inhibiția celulelor ciliate interne, deși nu s-a găsit o conexiune directă între cele două tipuri de celule ciliate.

Celulele ciliate sunt în contact cu două medii lichide diferite: *endolimfa* ce umple cavitatea dintre organul lui Corti și membrana tectoria și *perilimfa* ce umple cavitatea dintre organul lui Corti și membrana bazilară.

Endolimfa este în contact cu lichidele din spațiile sistemului vestibular și este caracterizată de un mare conținut de ioni de potasiu.

Perilimfa este caracterizată de un conținut mai mare de sodiu la fel ca și alte lichide din organism (de ex.: LCR – lichidul cefalorahidian) cu care este în contact.

Pierderile ionice sunt echilibrate de pompele ionice concentrate în membranele unui grup de celule specializate aflate în peretele extern al cohleei, în *stria vascularis*.

17.2. Hidrodinamica urechii interne

Presiunea mecanică exercitată de unda sonoră asupra structurilor din urechea externă și medie se transmite la nivelul

structurilor din urechea internă determinând oscilații ale membranei bazilare (Haulică I. și Topoliceanu F., 1999).

Georg von Bekesy (Premiul Nobel pentru investigarea mecanismelor percepției auditive) a confirmat o ipoteză emisă anterior de Helmholtz referitor la frecvențele undelor sonore care pun în mișcare diverse porțiuni ale acestei membrane, sunetele de frecvențe mari inducând oscilații în extremitatea dinspre *fereastra ovală*, iar cele de frecvențe mici în extremitatea opusă (lângă *helicotrema*).

Membrana bazilară este formată dintr-o serie de aproximativ 42.000 de fibre transversale prinse într-o substanță fundamentală omogenă. Aceste fibre au lungimi mici în extremitatea din zona ferestrei ovale (40 microni), apoi lungimile cresc progresiv ajungând la 500 microni în extremitatea din zona helicotreamei (un orificiu cu aria secțiunii de $0,25 - 0,40 \text{ mm}^2$), astfel că membrana are o grosime din ce în ce mai mare dinspre partea apicală spre cea bazală.

Modelul mecanic ce descrie destul de bine modalitatea de oscilație a membranei bazilare este cel al unei serii de pendule mecanice de diferite lungimi (crescătoare progresiv) și diferite dimensiuni și mase ale corpului sferic suspendat, aflate în contact mecanic (Figura 118). Se consideră că toate primesc

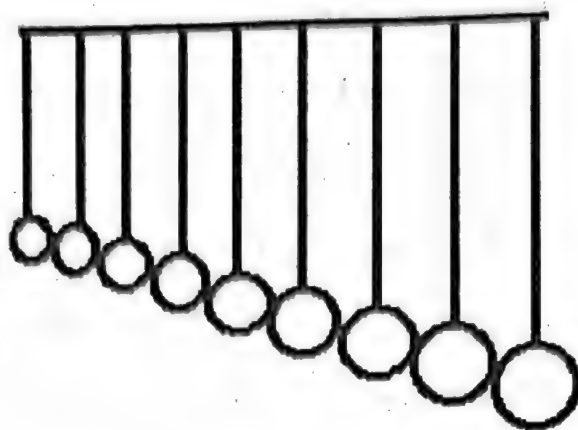


Figura 118. - Modelul mecanic propus de von Békésy pentru explicarea oscilațiilor membranei bazale

simultan un impuls mecanic perpendicular pe planul în care sunt suspendate (vertical) - de la o bară orizontală. De aceea pendulele intră în vibrație cu frecvențe diferite, cu faze diferite și chiar cu amplitudini diferite, oscilațiile lor nefiind independente - undă progresivă, iar nu staționară (ce se propagă de la pendulul mai scurt și mai ușor la cel mai lung și mai greu), (Haulică I. și Topoliceanu F., 1999).

Dacă frecvențele variază liniar de la o extremitate la alta, amplitudinile sunt mici lângă fereastra ovală (zona apicală a membranei bazilare), ating un maxim și apoi scad din nou lângă helicotrează (zona bazală a membranei bazilare).

17.3. Bioelectrogeneza celulelor ciliate

Pozițiile relative ale celor două membrane, bazilară și tectoria, diferite în funcție de solicitarea mecanică a stimulului sonor, determină apariția unor forțe de încovoiere ce acționează asupra cililor îndoindu-i într-o parte sau cealaltă. Ca urmare, în celulele ciliate apar potențiale electrice de acțiune care pot fi atât depolarizări cât și hiperpolarizări electrice ale membranei celulare.

Depolarizările apar când cilii se îndoaie către kinocil iar hiperpolarizările când cilii se îndoaie în sens opus kinocilului. În primul caz celulele nervoase cu care fac sinapsă celulele ciliate sunt excitate, în al doilea caz nu sunt excitate, ci sunt inhibate.

Potențialul membranal de repaus nu este modificat de forțele ce acționează perpendicular pe cili. Valoarea acestui potențial de repaus din celulele ciliate ca și din cele neuronale este de circa - 60 mV.

Undele sonore de intensitate și frecvență adecvată particularităților de percepție a fiecărei specii determină apariția potențialelor de acțiune (potențiale de receptor) caracterizate atât de o componentă continuă cât și de una alternativă.

La frecvențe relativ joase, raportul dintre amplitudinea componentei alternative și a celei continue este de $1/7$. Potențialele de receptor determină eliberarea de neurotransmițător în sinapsa nervoasă aferentă.

Înregistrări electrofiziologice la nivelul cohleei au arătat că în *stria vascularis* este generat un potențial electric pozitiv de 80-100 mV, măsurat în raport cu perilimfa, caracterizat de asemenea de două componente, una continuă și una alternativă.

Măsurători asupra mișcării membranei bazilare, efectuate prin intermediul efectului Mössbauer au adus unele date suplimentare relativ la comportarea în domeniul amplitudinilor mari ale acestor mișcări. S-a detectat atât o componentă liniară cât și una neliniară.

Nelinaritățile au fost evidențiate prin metode psihoacustice, în special pentru nivele înalte de intensitate sonoră. Pe de altă parte, la unele specii de mamifere, neliniaritățile s-au evidențiat sub forma apariției unei curbe de saturație, dar numai pentru sunete sub 70 dB (Figura 119).

Investigații neurofiziologice la nivelul celulelor ciliate, a unor fibre nervoase și a unor celule nucleate din cohlea, au arătat neliniarități semnificative, atât la nivelul potențialelor de acțiune continue cât și a celor alternative. Astfel, aceste potențiale, ca și rata lor de descărcare în fibrele nervoase, cresc

repede după ce trec de un anume prag, dar se saturează la o anumită valoare a intensității stimulului sonor. Acest rezultat este aproape independent de frecvență și de specia de animal investigat.

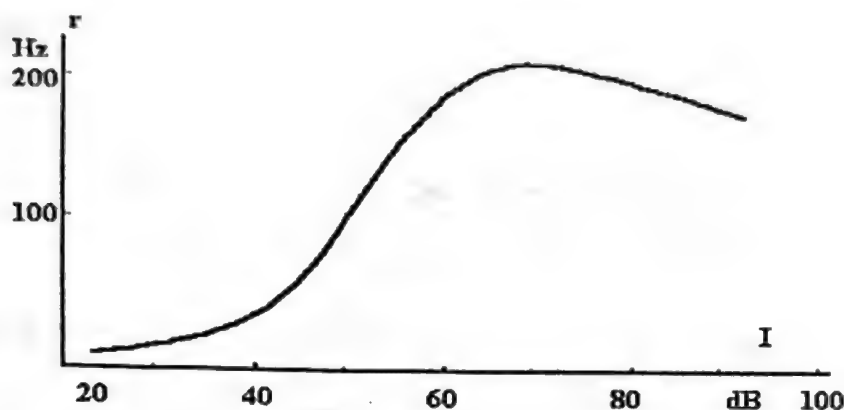


Figura 119. - Rata de descărcare, r , a impulsurilor electrice printr-o fibră nervoasă în funcție de intensitatea stimulului sonor, I , este o curbă saturată

În concluzie, cel mai probabil este că, deși mișcarea membranei bazilare este în principal liniară, componenta neliniară ar putea să fie dată de mișcarea membranei tectoria și a organului lui Corti.

17.4. Procesarea informației auditive în sistemul nervos central

Fibrele nervoase care transmit semnalele receptate la nivelul urechii interne sunt în număr de circa 30.000 și principalele diferențe dintre anumite categorii de astfel de fibre

sunt legate mai ales de pragul de frecvență. Partea bazilară a fibrei este cea care are rolul determinant în selectivitatea unui grup de fibre nervoase față de frecvențele sunetelor prelucrate și transmise ca semnale electrice la creier. Astfel un sunet complex care este o suprapunere de mai multe sunete cu diferite frecvențe joase, stimulează câteva grupe mici de fibre nervoase dar o suprapunere de sunete de diferite frecvențe înalte stimulează mai multe grupe de fibre nervoase.

Deci, selectivitatea față de frecvența stimulilor este mai mare pentru domeniul frecvențelor mici și mult mai redusă în domeniul frecvențelor mari. De asemenea fibrele nervoase auditive pot să difere prin sensibilitate. Totuși într-un domeniu de frecvențe dat, pragul de sensibilitate al fibrelor diferă puțin (cu până la 20 dB), astfel că se poate presupune că un stimul care are o intensitate cu 20 dB peste pragul celei mai sensibile fibre este capabil să stimuleze toate fibrele din zonă. Spre deosebire de sistemul vizual, descărcarea din nervul auditiv nu conține nici o informație despre localizarea spațială a sursei.

CAPITOLUL 18

Biofizica contracției musculare


Celulele musculare (fibrele musculare) s-au diferențiat la organisme superioare din regnul animal, odată cu dezvoltarea unui sistem muscular specializat în efectuarea funcției de motricitate. Nu trebuie de uitat că sisteme contractile există aproape la toate celulele vii, manifestându-se la nivelul întregii celule (amibe, spermatozoizii, ș.a., care se deplasează în mediul extern) sau la nivelul unor organite celulare (mitocondrii, cloroplaste, ș.a. care își modifică forma și volumul) - motilitatea manifestându-se ca o însușire generală a materiei vii.

În marea majoritate a cazurilor, contracția spațială este efectuată de complexul de proteine actină - miozină, capabil de tranziții din stări conformaționale extinse în stări conformaționale restrânse, cu consum de energie din reacțiile exergonice cu care este cuplat, de exemplu hidroliza ATP-ului.

18.1. Structura fibrei musculare striate

Mușchiul striat este alcătuit dintr-un număr mare de celule musculare, celule alungite (cu lungimea de până la câțiva cm) aranjate paralel cu direcția de contracție. Fiecare celulă musculară este prevăzută cu mai mulți nuclei, situați marginal, către membrană (sarcolema).

Elementele contractile sunt organele celulare specifice numite *miofibrile*. Miofibrilele sunt alcătuite din filamente groase de *miozină* (câte 400 de molecule de miozină în constituția fiecărui filament gros), în jurul fiecărui filament gros fiind dispuse câte șase filamente subțiri, de *actină*.



La examinare cu ajutorul microscopului optic cu contrast de fază sau cu lumină polarizată miofibrilele prezintă un aspect striat - o alternanță de zone opace, întunecate și zone luminoase sau izotrope. Zonele luminoase sunt denumite zone I (izotrope, care refractă slab lumina) și sunt traversate de o linie întunecată - stria Amici, notată cu Z. Ele sunt alcătuite din filamente de actină. Zonele întunecate sunt denumite zone A (anizotrope, care refractă puternic lumina) și sunt alcătuite din filamente de miozină (Figura 120). Ele prezintă o bandă centrală

mai luminoasă, banda H (banda Hensen) care la rândul său are la mijloc o linie întunecată, linia M (Figura 121).

Între două linii Z consecutive este delimitat un sarcomer a cărui lungime ajunge la 2 microni. Reticulul endoplasmic (sarcoplasmic) din celula musculară striată prezintă un sistem de canalicule longitudinale (tubuli L) și transversale (tubuli T).

Tubulii T comunică cu exteriorul dar nu și tubulii L. Aceștia din urmă prezintă numeroase anastomoze iar la nivelul joncțiunii dintre zonele I și zonele A prezintă niște cisterne transversale în care se acumulează calciul ionic.

Complexele structurale și funcționale alcătuite din cisternele derivate din tubulii L și terminațiile tubulilor T se numesc triade și la studiul și caracterizarea lor o contribuție semnificativă a revenit și savantului de origine română George Emil Palade (Premiul Nobel 1974).

Rolul canaliculelor transversale constă în preluarea semnalelor excitatoare de la membrana presinaptică (celula nervoasă) la nivelul membranei postsinaptice (celula musculară) și transmiterea lor spre interior.

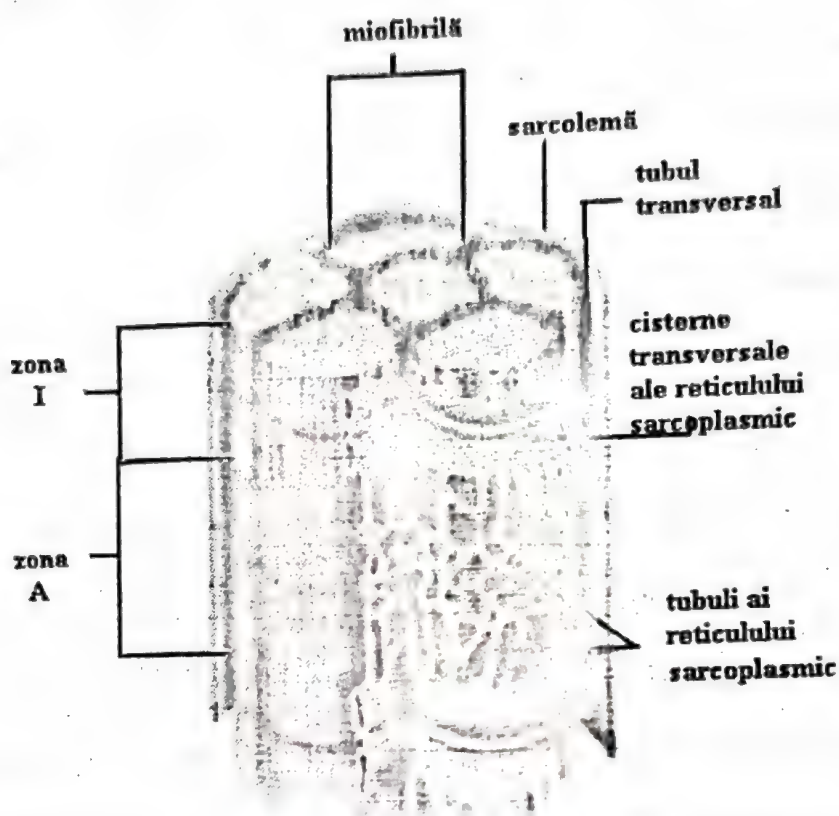


Figura 120. - Imagine tridimensională a unui ansamblu de șase miofibrile. Se observă tubulii transversali, longitudinali și cisternele reticulului sarcoplasmic (J. Darnell și col. 1990)

Mitocondriile din celula musculară (sarcozomii) sunt sediul unei intense activități enzimatică prin care se eliberează mari cantități de energie prin procesele de fosforilare oxidativă pentru a se stoca parțial în moleculele macroergice cum sunt cele de ATP și PC (creatinfosfat - un fosfagen specific vertebratelor).

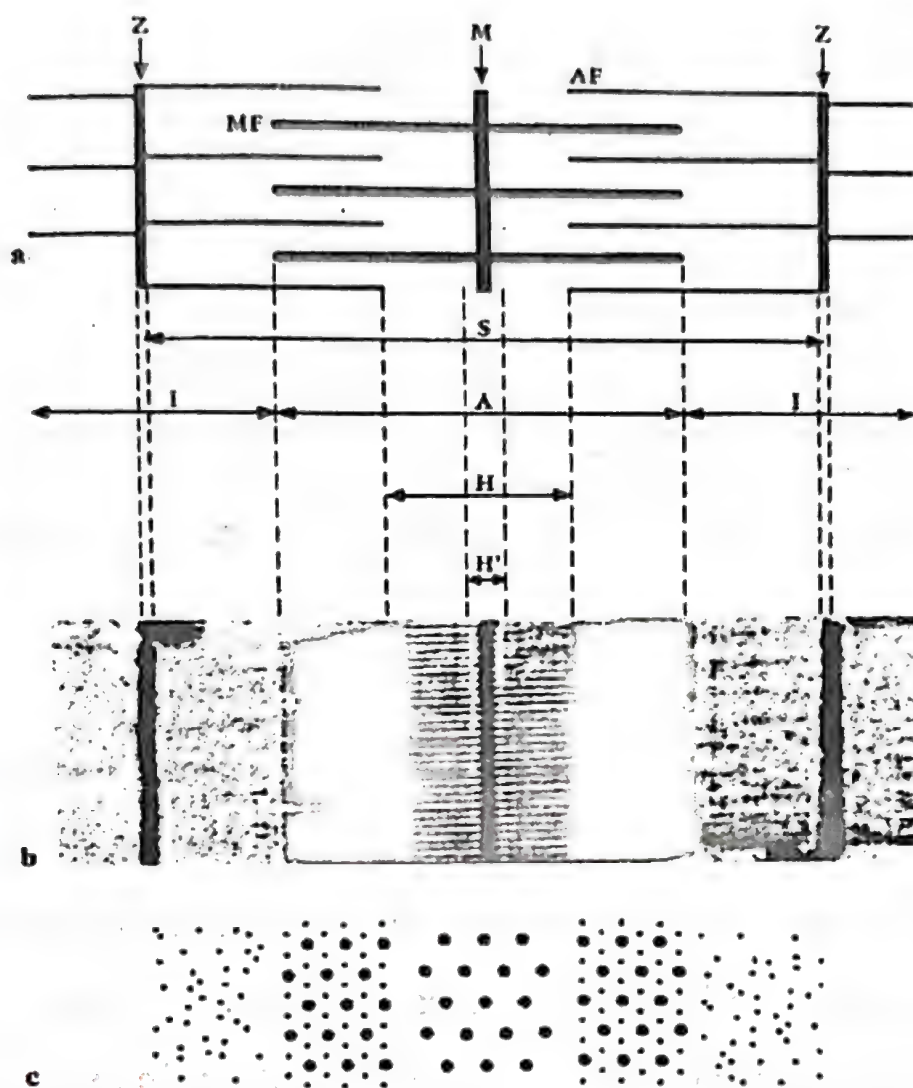



Figura 121. a - Imaginea striată a miofibrilelor din componenta mușchiului striat, așa cum apare la microscopul electronic; b - Reprezentarea schematică a imaginii propriu-zise obținută la microscopul electronic; c - Reprezentarea schematică a secțiunilor transversale de la diferite niveluri ale sarcomerului (cercurile mari corespund filamentelor groase iar cercurile mici filamentelor subțiri) (W. Hope și col. 1983)

18.2. Mecanismul contracției musculare

18.2.1. Controlul sinaptic al contracției musculare

Controlul contracției musculare este realizat la nivelul joncțiunii neuromusculare. Funcționarea acestei joncțiuni se bazează pe mai multe tipuri de canale ionice: *canale dependente de voltaj, canale controlate de acetilcolină, canale controlate de ioni de calciu.*



Joncțiunea este activată de impulsul nervos care se propagă în celula nervoasă până la nivelul terminalului care inervează celula musculară (face sinapsă chimică cu această celulă). Impulsul nervos depolarizează membrana celulei presinaptice (nervoase) activând canalele de calciu dependente de voltaj, care se deschid, permițând penetrarea calciului prin axolemă (în mod normal concentrația de calciu extracelular este superioară cu câteva ordine de mărime celei din citoplasmă). Imediat se eliberează în spațiul sinaptic vezicule cu acetilcolină din butonul terminal al celulei nervoase.

Moleculele de acetilcolină sunt receptate la nivelul membranei postsinaptice de receptori de acetilcolină din constituția canalelor ionice pentru cationi, care sunt canale ionice controlate de acetilcolină. Deschiderea acestor canale

înseamnă în primul rând un influx masiv de ioni de sodiu în celula musculară. Aceștia depolarizează membrana postsinaptică determinând activarea unor canale de sodiu dependente de voltaj. În timp, acetilcolina este degradată în spațiul sinaptic receptori membranari se eliberează și ei devenind disponibili pentru receptarea de noi molecule de acetilcolină.

Mecanismul de activare, în continuare, a canalelor de calciu din membranele depozitelor intracelulare de calciu de la nivelul reticulului sarcoplasmic din celula musculară, nu este suficient de bine cunoscut, dar rolul său este esențial în contracția musculară.

Contracția musculară se declanșează ca urmare a creșterii concentrației citoplasmatică de calciu, în principal prin golirea acestor cisterne de calciu intracelular. Reumplerea lor se realizează prin intermediul pompelor de calciu, existente în membranele acestor organite celulare.

18.2.2. Cuplul excitație-contracție

Depolarizarea membranei celulei musculare, sarcolema, (determinată de impulsul nervos care acționează la nivelul joncțiunii neuromusculare) este transmisă spre interiorul celulei

prin intermediul canaliculelor transversale ale reticulului sarcoplasmic. Este vorba de activarea unor canale de calciu sensibile la voltaj din sarcolemă (ca urmare a depolarizării sarcolemei), care sunt cuplate cu canalele de calciu de la nivelul membranei reticulului sarcoplasmic. Canalele de calciu astfel activate permit extruzia calciului prin transport pasiv.

Cisternele de calciu de la nivelul reticulului sarcoplasmic se descarcă determinând modificarea concentrației de calciu din citoplasmă de la 10^{-8} M (în lipsa excitației) până la 10^{-6} - 10^{-5} M. Ioni de calciu activează sistemul troponină - tropomiozină. (Figura 122)

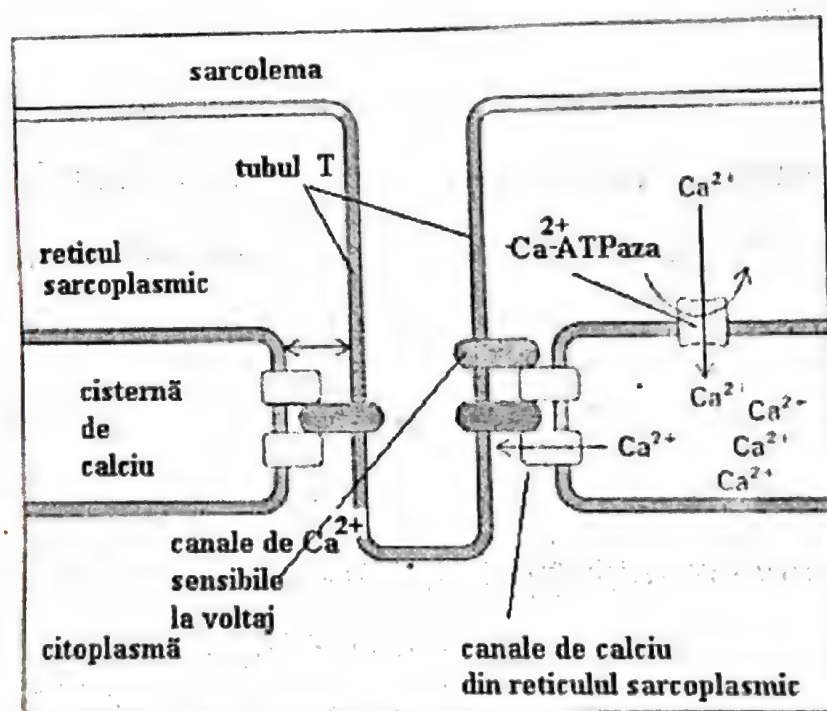


Figura 122. - Depozitele intracelulare de calciu, canalele și pompele ionice de calciu din membranele acestora (J. Darnell și col. 1990)

Troponina reprezentată din trei subunități: TnC, TnI, TnT. La o concentrație mică de calciu intracelular subunitatea TnI este cea care se leagă la filamentul de actină blocând contracția. La o concentrație mare de calciu intracelular subunitatea TnC poate cupla în mod reversibil până la patru ioni de calciu, activând aparatul contractil al celulei. Subunitatea TnT interacționează cu celelalte două subunități conectându-le precum și cu tropomiozina (Tm). Moleculele de troponină interacționează cu filamentele de tropomiozină care se împletesc cu cele de actină.

Activarea sistemului troponină - tropomiozină antrenează glisarea filamentelor de actină printre cele de miozină (Maenhout M. and all., 1998).

În acest fel contracția musculară în final se realizează prin întrepătrunderea filamentelor de actină cu cele de miozină.

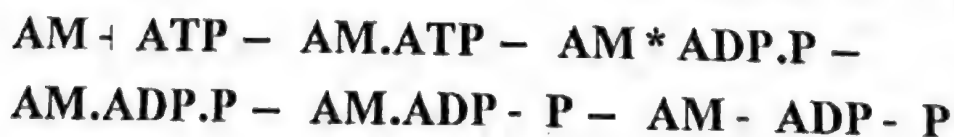
În prezența ionilor de magneziu, segmentele S2 ale miozinei, ca urmare a semnalului dat de creșterea concentrației citoplasmatică de ioni de calciu, se cuplează cu monomeri de actină din constituția filamentelor subțiri. Se formează astfel complexe actină - miozină bogate în energie, prin existența la nivelul segmentului S2 a unui situs de legare a moleculei macroergice de ATP și de activitate ATP - azică.

Odată cu formarea complexului acto – miozinic, molecula de ATP aferentă se scindează în ADP și fosfat eliberând energie și în acest fel se poate efectua o micșorare a unghiului dintre S2 și direcția filamentului cu circa 54 de grade. Deoarece cuplajul miozinei cu actina se menține, această deformare mecanică se traduce tocmai prin glisarea filamentului de miozină față de cel de actină, adică scurtarea sarcomerului, realizându-se astfel o deplasare de circa 100 Å (Ångstromi) pentru fiecare sarcomer. (Figura 123)

Pentru decuplarea filamentului de miozină de cel de actină este necesară atașarea unei noi molecule de ATP din citoplasmă (complexul actomiozinic a rămas sărac în energie). Din acest moment asistăm la reluarea mecanismului ciclic contractil (Haulică I. și Topoliceanu F., 1999)

În lipsa moleculelor de ATP din citoplasmă miofibrilele nu mai pot ieși din starea de contracție, fenomen de rigiditate spastică cunoscut sub numele de *rigor*.

O schemă a transformărilor prin care trece complexul acto - miozinic ATP - azic poate fi redată astfel:



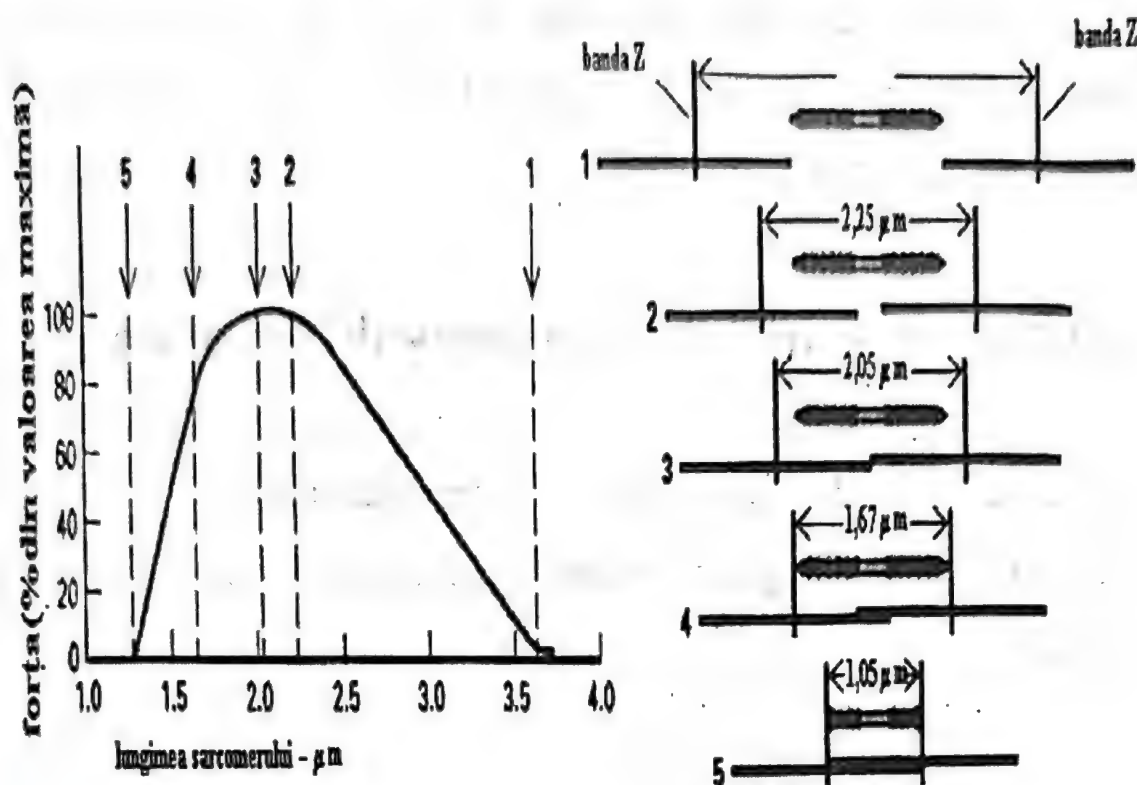


Figura 123. - Relația dintre lungimea sarcomerului și forța generată în timpul contracției izometrice (după J. Darnell și col. 1990)

unde: **AM** este complexul actomiozinic bogat în energie, **AM*** este complexul actomiozinic dezenergizat, iar **P** este gruparea fosfat.

Interesul deosebit suscitât de problematica complexă a contracției musculare, de factorii care pot influența mecanismele energetice implicate, a condus la o serie de studii sistematice întreprinse și în țara noastră, cu sprijinul unor universități din Germania, Elveția și Suedia (M. Isac și R. M.

Isac 1984; M. Isac și col. 1984; F. Topoliceanu și col. 1984; M. Isac și R. M. Isac 1985; M. Isac și col. 1991; M. Isac și col. 1992; R. M. Isac și col. 1997; R. M. Isac și col. 1999; D. E. Creangă și col. 1998).

18.3. Noțiuni de termodinamica contracției musculare

Expresia primului principiu al termodinamicii în cazul transformărilor energetice suferite de mușchi poate fi scrisă astfel:


$$dU = dQ + Fdl + dU_{ch} \quad (178)$$

unde: dl este variația de lungime a mușchiului sub acțiunea forței constante F , dU este variația energiei interne, dQ este cantitatea de căldură schimbată cu exteriorul iar dU_{ch} reprezintă variația de energie sub formă de energie chimică.

Contracția musculară se referă atât la cazul când mușchiul dezvoltă forță (tensiune) fără a-și modifica lungimea - *contracția izometrică* - cât și la cazul când mușchiul își reduce lungimea sub acțiunea unei forțe constante - *contracția izotonică*.

Dacă se consideră un mușchi izolat care nu schimbă substanță cu mediul, atunci se poate neglija schimbul de energie chimică și avem cazul contracției izotonice:

$$dU_{F=\text{const}} = dQ_{F=\text{const}} + Fdl \quad (179)$$

Cantitatea de căldură degajată de mușchi la fel ca și lucrul mecanic pe care acesta îl poate efectua depind, în mod evident de încărcarea sa (forța). Când forța ajunge la valoarea maximă la care se poate efectua o deplasare a punctului său de aplicație (F_0), atunci se poate spune că mușchiul funcționează în condiții izometrice. Deci pentru:

$$l = \text{const} \quad (180)$$

avem:

$$dl = 0 \quad (181)$$

iar variația energiei interne se regăsește numai sub formă de căldură:

$$dU_{l=\text{const}} = dQ_{l=\text{const}} \quad (182)$$

S-a arătat că energia totală eliberată de un mușchi este mai mare în cazul contracției izotonice decât în cazul contracției izometrice (efect Fenn) și poate fi scrisă ca:

$$\frac{d(U_{F=\text{const}} - U_{l=\text{const}})}{dt} = \frac{d(Q_{F=\text{const}} - Q_{l=\text{const}})}{dt} + \frac{Fdl}{dt} \quad (183)$$

Ultimul termen din membrul al doilea reprezintă puterea dezvoltată.

Studiile efectuate asupra dependenței variației de energie internă în funcție de variația de căldură (în cele două tipuri de contracții musculare) au arătat că randamentul maxim al producerii de lucru mecanic corespunde la o forță egală cu 30% din F_0 .

Între forța care acționează asupra mușchiului și viteza de contracție s-a găsit pe cale empirică (A. F. Hill, 1930) o relație de forma:

$$(F + a)(v + b) = \text{const.} = (F_0 - a)b \quad (184)$$

unde: a și b sunt constante cu dimensiunile unei forțe, respectiv a unei viteze și sunt specifice fiecărui tip de mușchi. Este

evident că valoarea maximă a forței, F_0 , corespunde unei viteze nule de contracție. Dacă se scoate expresia vitezei de contracție din relația anterioară atunci se obține:

$$v = \frac{(F_0 - F)b}{F + a} \quad (185)$$

de unde se obține și valoarea maximă a vitezei:

$$v_{\max} = \frac{F_0 b}{a} \quad (186)$$

ceea ce corespunde contracției libere ($F=0$).

Relația stabilită de Hill s-a bazat pe observații experimentale efectuate asupra mușchiului sartorius de la broască și se referă la posibilitatea acestuia de a se contracta în condițiile în care este tetanizat (K. A. P. Edman, 1975). Astfel mușchiul se menține la lungime constantă prin fixarea capetelor sale. El este stimulat electric la o tensiune și frecvență suficient de mare, astfel ca în mușchi să se dezvolte tensiunea maximă F_0 pentru lungimea fixată. În acest moment mușchiul tetanizat se lasă liber la unul din capete sub acțiunea unei forțe de tensiune F mai mică decât valoarea maximă atinsă anterior.

Mușchiul începe să se contracte cu viteza v . Modificând valoarea forței de tensiune se modifică și valoarea vitezei de contracție. Graficul de variație $F(v)$ are forma de mai jos și este bine aproximat de relația dedusă empiric de Hill (Figura 124).

Studii amănunțite efectuate ulterior au arătat că relația stabilită de Hill este riguros exactă numai în domeniul de valori de la 0,9 la 1,25 pentru raportul dintre lungimea mușchiului în timpul contracției (l) și lungimea sa inițială (l_0).

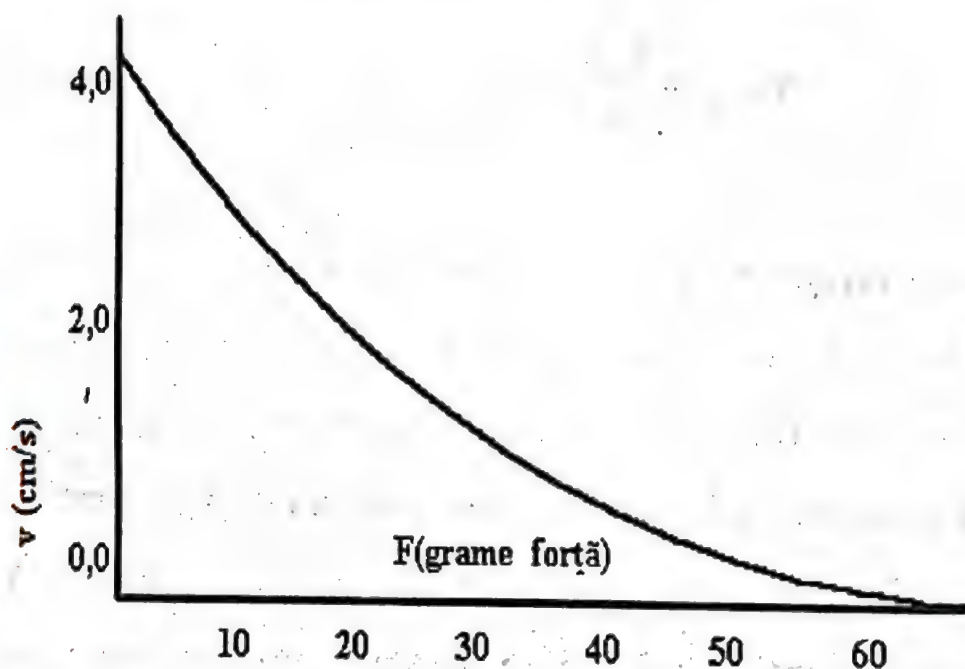


Figura 124. - Dependența vitezei de contracție de forța de tensiune în cazul mușchiului tetanizat (după M. Isac 1987)

18.4. Modelul fizic al musculaturii cardiace

Pentru explicarea numeroaselor rezultate ale cercetărilor care au urmărit comportarea elementelor active ale musculaturii

cardiace sub acțiunea forțelor de sollicitare mecanică, (Edman și Nilsson 1968) s-au propus relații cantitative de tipul celei de mai jos:

$$\frac{dF}{dl} = \alpha(F + \beta) \quad (187)$$

unde: F este forța de întindere, de exemplu, l este alungirea iar α și β sunt constante. Relația este evident diferită de legea deformărilor elastice (relația 187):

$$\frac{F}{\Delta l} = \frac{ES}{l_0} \quad (188)$$

în care raportul dintre forța elastică și alungirea cauzată este egal cu raportul unor constante: E -modulul de elasticitate, S -suprafața secțiunii transversale și l_0 lungimea inițială. Se vede că în relația (185) propusă mai sus, acest raport nu mai este constant, ceea ce echivalează cu a spune că modulul de elasticitate variază sub acțiunea forței.

Modelul fizic corespunzător este cel al unui resort cu modul de elasticitate proporțional cu valoarea forței care îl soliciță (Figura 125).

Integrarea ecuației diferențiale de ordinul întâi presupune separarea variabilelor:

$$\frac{dF}{F + \beta} = \alpha dl \quad (189)$$

Prin integrare se obține o relație logaritmică:

$$\ln(F - \beta) = \alpha l - C \quad (190)$$

unde C este o constantă de integrare ce se poate explicita din condițiile inițiale. Astfel, să punem condiția că la o valoare F_0 a forței, lungimea este l_0 :

$$\ln(F_0 - \beta) = \alpha l_0 - C \quad (191)$$

Înlocuind expresia care rezultă pentru constanta de integrare se obține:

$$\ln(F - \beta) = \alpha(l - l_0) - \ln(F_0 - \beta) \quad (192)$$

Compactând cei doi logaritmi și trecând la forma exponențială obținem:

$$F + \beta = (F_0 + \beta)e^{\alpha(l-l_0)} \quad (193)$$

Valoarea constantei α în cazul musculaturii cardiace la pisică se obține ca fiind egală cu 0,4 pentru o secțiune transversală cu suprafața de $0,98 \text{ mm}^2$, o preîncărcare de 0,5 g și o extensie elastică de 4 - 5% din lungimea inițială pentru o tensiune dezvoltată de 1 g/cm^2 (corespunzător unei încărcări de 10 g), în timp ce constanta β corespunde la valoarea de 2g.

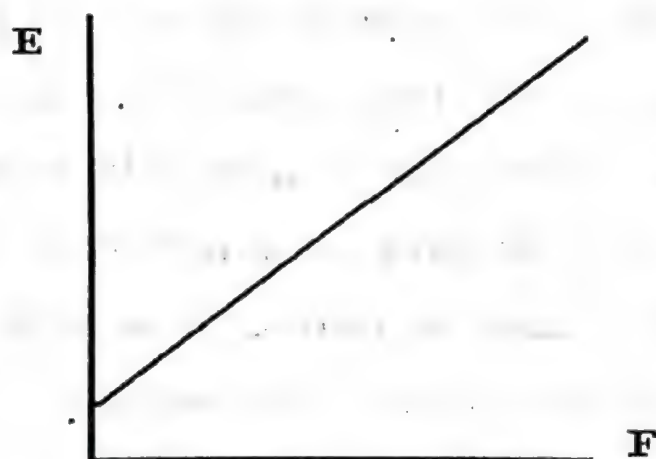



Figura 125. - Modulul de elasticitate al unui mușchi cardiac depinde liniar de forța de tensiune aplicată.

Expresia acestei a doua constante rezultă ca o funcție de prima din condiția ca la o forță nulă ($F = 0$) să corespundă o alungire nulă ($l = 0$):

$$\beta = \frac{F_0 e^{-\alpha/\alpha_0}}{1 - e^{-\alpha/\alpha_0}} \quad (194)$$

În formă grafică măsurătorile experimentale conduc la o dreaptă ce descrie variația liniară a modului de elasticitate cu mărimea forței: $E = f(F)$ (Figura 125).

18.5. Elemente de biomecanica tendonului și ligamentelor musculaturii striate



Exercitarea funcțiilor sistemului muscular presupune o bună joncțiune cu elementele sistemului osos, ceea ce se realizează prin intermediul tendoanelor și ligamentelor. Dacă *tendonul* realizează în principal *transmiterea uniaxială a forțelor* la joncțiunea mușchi-os, *ligamentul* efectuează *transmiterea forțelor cu o distribuție și orientare mai complexă* (câmpul de forțe rezistive se reflectă în direcționarea fibrelor de collagen), cu caracter reversibil, asigurând deformări mai mari cu circa 20% decât tendonul (Wang, 1973).

Colagenul reprezintă circa 75-80% din masa uscată a tendonului, elastina mai puțin de 3%, iar proteoglicanii circa 1-1,5%, în timp ce la majoritatea ligamentelor elastina este în proporție de 5% și proteoglicanii sunt în proporție de 2,5-3%

(dar conținutul de elastină poate ajunge și la 80% - vezi *ligamentum nucae* la bovine).

18.5.1. Proprietăți de elasticitate

Curba tensiune - elongație a tendonului relevă proprietățile sale de elasticitate și este caracterizată de următoarele regiuni (Figura 126):

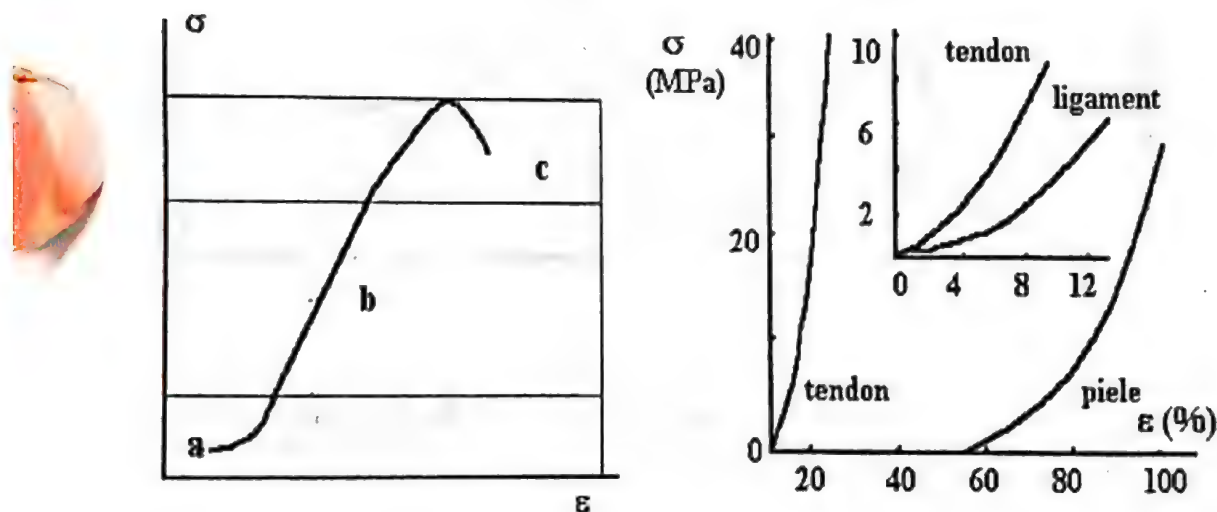


Figura 126. - Stânga: curba constrângere (efort unitar - elongație relativă, (σ/ϵ)) la tendon se caracterizează printr-o porțiune liniară centrală, între două porțiuni neliniare. Dreapta: curba constrângere - elongație relativă pentru tendon (porțiunea a), ligament și piele (modificat după A. Denischi 1989)

(a) - regiunea ascendentă lentă, corespunzătoare proceselor neliniare de organizare a fibrelor de collagen și a materialului necolagenic;

- (b) - regiunea ascendentă liniară, în care se manifestă proprietățile de elasticitate ale tendonului;
- (c) - regiunea vârfului curbei, ce corespunde proceselor neliniare de activare a proceselor vâscoase din rețeaua de collagen.

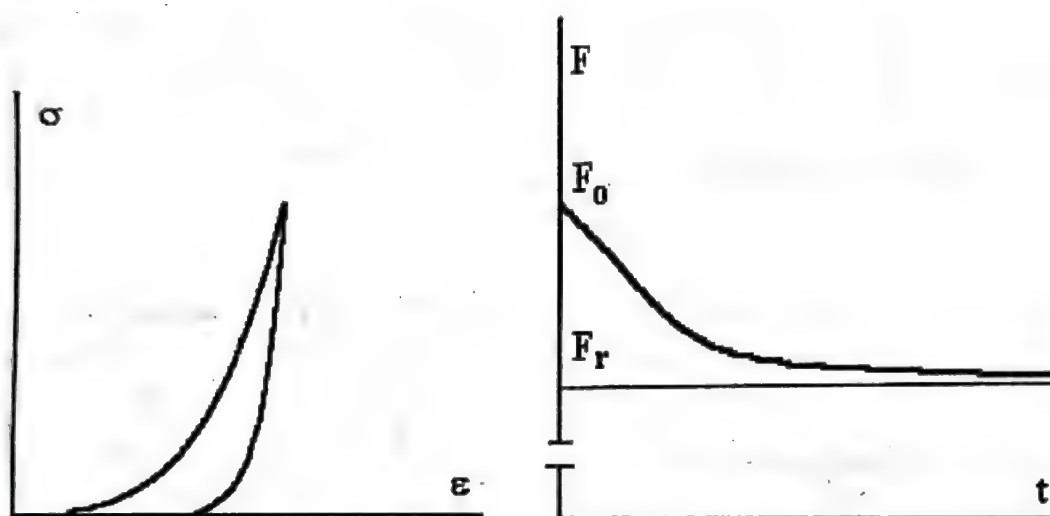


Figura 127. - Curba de histerezis (stânga) și curba de relaxare a forței în timp (dreapta) (după Viidik 1978, citat de A. Denischi și col. 1989).

Curbele experimentale de histerezis la încărcare - descărcare și curbele de relaxare a tensiunii la deformare constantă (Figurile 127-128) au relevat proprietățile de vâscoelasticitate ale structurilor colagenice din constituția tendonului.

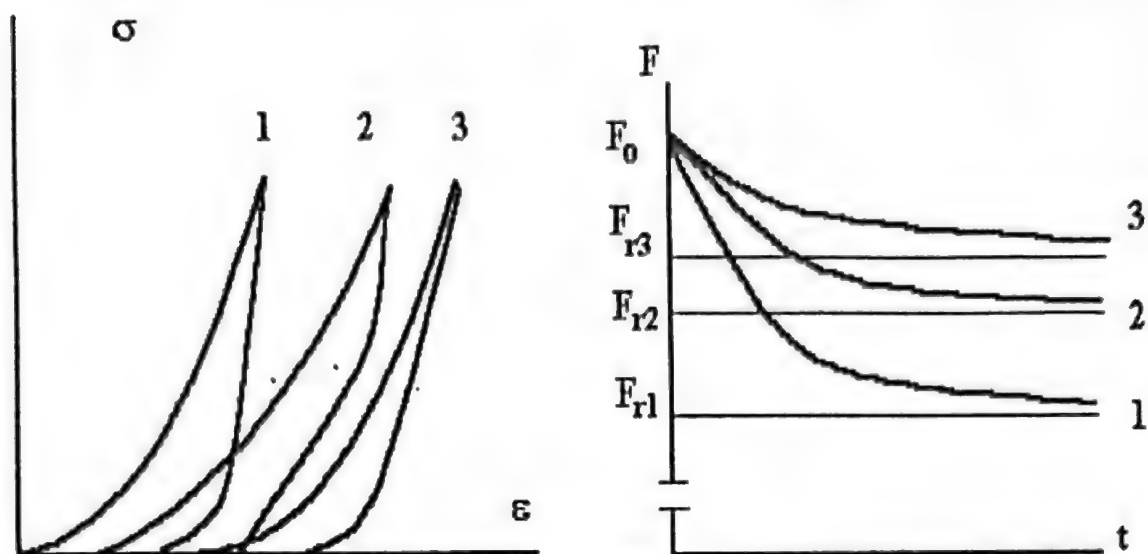


Figura 128. - Curbe de histerezis la încărcare-descărcare repetată (stânga); curbe de relaxare repetate (dreapta) (după Viidik, 1978 citat de A. Denischi și col. 1989).

18.5.2. Proprietăți de vâscoelasticitate

Proprietatea de vâscoelasticitate se manifestă prin faptul că, analog cu cazul pereților vaselor sangvine, o parte din energia de deformare elastică nu se restituie tot sub forma de energie mecanică ci se disipă sub formă de căldură, astfel că la scăderea constrângerii elongația nu mai scade la valoarea inițială. Tensiunea din țesut nu se mai reduce la aceeași valoare la repetarea experimentului de relaxare.

Comparația dintre proprietățile elastice ale collagenului, tendonului, ligamentului și țesutului cutanat, arată că panta

curbei (dată de modulul de elasticitate, E), scade pe măsură ce crește gradul de dezordonare din structura analizată: *pielea* reprezentând o rețea tridimensională dezordonată în care colagenul este în proporție de 65-70 % din substanța uscată, elastina este în proporție de 5-10 % iar proteoglicanii în proporție de 2% (Woo 1968, citat de A. Denischi și col. 1989).

Funcțiile mecanice pe care le îndeplinesc structurile membranare de tip strat (cum poate fi considerată și *pielea*) sunt legate de necesitatea de a rezista la *eforturi de întindere biaxială, forfecare laminară și de apăsare verticală* în cazurile statice precum și la *eforturi de pliere* în cazul mișcărilor segmentale.

În cazul dermului, gradul de organizare a rețelei de colagen diferă mult de la specie la specie, fiind, de exemplu, destul de înalt la nevertebrate, la care poziția normală a corpului se bazează pe principiul tubului turgid (sub presiune) sau la pești, unde fibrele sunt dispuse paralel, în straturi laminare dar fiind caracterizată de un nivel înalt de dezordonare la vertebrate unde se prezintă ca o rețea tridimensională, anizotropă.

18.5.3. Elemente de biomecanica tendonului și ligamentului

Cartilajul conține mai multă apă decât tendonul (70-80 % față de 65-70 %), colagenul este în proporție de 60-65 % iar proteoglicanii în proporție de 10-15 %. Față de structurile prezentate anterior cartilajul trebuie să îndeplinească funcții mecanice de *rezistență la tensiuni de comprimare* precum și *comportament specific la tensiunile de forfecare*, pentru asigurarea suportului și formei, respectiv pentru limitarea fricțiunilor interosoase.


În viziune modernă, cartilajul este un material compozit, cu trei componente: populații de *celule* imersate într-o *matrice intercelulară* și străbătute de un *sistem de fibre*. Cartilajul este văzut ca un țesut complex cu aranjament fibros ultrastructural, biologic activ și complex din punct de vedere reologic.

Pentru evaluarea proprietăților sale biomecanice, se definesc mărimi cum sunt: constrângerea Lagrangiană, T și constrângerea Kirchhoff, S , astfel:

$$T = \frac{F}{A_0} \quad (195)$$

$$S = \frac{T}{\epsilon} \quad (196)$$

unde : A_0 este aria secțiunii inițiale, a cartilajului netensionat, F este forța de tensiune aplicată, ϵ este (deformația) elongația relativă. Experimente *in vitro* cu cartilajul articular femural bovin, imersat în soluție salină la 37 grade Celsius și tensionat ciclic în intervalul $\lambda \in (1.07-1,10)$ au arătat că T scade de la 24 MN/m^2 la 12 MN/m^2 în decurs de opt secunde (Woo 1979 citat de Y. C. Fung 1981).



Osul se prezintă tot ca un material compozit cu trei elemente: celulele osoase, fluidul extracelular și materialul solid extracelular, numit matrice osoasă. Din punct de vedere chimic, este un ansamblu de structuri de collagen și hidroxiapatită, astfel că și din punct de vedere mecanic prezintă un model de elasticitate (modelul lui Young) cu valori intermediare între cele ale collagenului și hidroxiapatitei și o duritate mai mare decât a oricăreia din cele două componente chimice (Haulică I. Și Topoliceanu I., 1999 ; Baran D. and all., 1999).

În funcție de maniera concretă de structurare a țesutului osos proprietățile elastice, vâscoelastice și de rezistență mecanică pot fi mult diferite. Matricea osoasă este solidă. Fluidul extracelular din țesutul osos este în contact cu plasma

sangvină prin intermediul căreia se alimentează cu materialul necesar sintezei matricii osoase (Stratone A. and all.,1999).

Un model matematic al procesului constitutiv trebuie să ia în considerare următoarele: vitezele de generare chimică a matricii osoase $u(v, \epsilon_{ij})$, fracția volumică de matrice generată, v , viteza de variație a fracțiunii volumice, \dot{v} , densitatea de masă locală, ρ . Dacă se cunosc valorile lui u și E atunci ecuațiile de formare pe cale internă se pot propune de forma:

$$\begin{aligned} \dot{v} &= \frac{u(v, \epsilon_{ij})}{\rho} \\ \sigma_{ij} &= v E_{ijkl}(v) \epsilon_{kl} \end{aligned} \quad (197)$$

unde : indicii de sumare i, j, k, l variază după cele trei direcții iar deformațiile sunt de forma:

$$\epsilon_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial l_i}{\partial x_j} + \frac{\partial l_j}{\partial x_i} \right) \quad (198)$$

(l_i fiind deplasările iar x_1, x_2, x_3 cele trei direcții carteziane). Deci , anizotropia procesului este redată prin intermediul tensorilor corespunzători atât fracțiunii de creștere volumică,

constrângerii, deformației relative (tensori de ordinul doi) cât și modulului lui Young (tensor de ordinul patru).

Pentru a exprima și creșterile pe cale externă atunci se va considera că avem un sistem de coordonate carteziene cu direcția x_3 normală la o suprafață considerată a osului (Figura 129) și cu direcțiile x_2 și x_1 în planul suprafeței, în raport cu care viteza de creștere a suprafeței în direcția x_3 este U :

$$U = k_{11}(\epsilon_{11} - \epsilon_{11}^0) + k_{22}(\epsilon_{22} - \epsilon_{22}^0) + k_{12}(\epsilon_{12} - \epsilon_{12}^0) \quad (199)$$

în care : k_{11} , k_{22} , k_{12} , și ϵ_{11}^0 , ϵ_{22}^0 , ϵ_{12}^0 sunt constante.

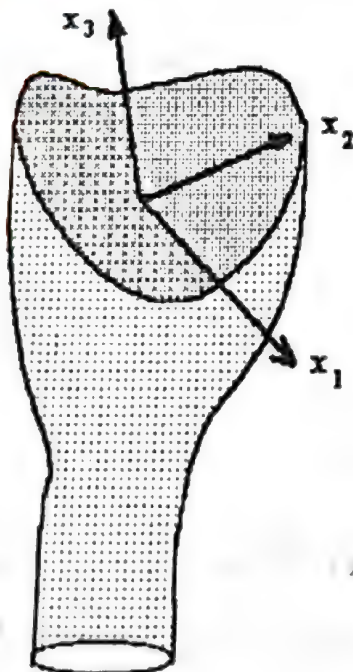


Figura 129. Sistemul de axe atașate unei suprafețe osoase pentru modelarea matematică a creșterilor

Dacă în relația 199, membrul drept este de o valoare pozitivă, atunci suprafața considerată este în curs de mărire, iar dacă

avem o valoare negativă atunci suprafața considerată este în curs de reducere. Pentru ca această ecuație să reflecte și acțiunea de remodelare a suprafeței osului pe baza forțelor ce acționează asupra acestuia, ea trebuie să ia forma:

$$U = k_{ij} \left[\epsilon_{ij}^2 - (\epsilon_{ij}^0)^2 \right] \quad (200)$$

Cu aceste ecuații se pot determina distribuțiile constrângerilor și deformațiilor în țesutul osos și se pot anticipa remodelările acestuia din surse interne și externe.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1989), *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York, London
2. Apostol I., Topoliceanu F., Stratone A., Botez P., Olaru D., Budescu E., Costin H., Matei D., Cojocaru C., Ciupilan D., Ciorap R., Gura A., (1999): Ergometric and electrophysiologic explorations of the joint – muscle system biomechanics, XV^{eme} Session des Journées Médicales Balkaniques ,Programme,nr.7.
3. Aurengo A., Auvert B., Gremy F., Leterrier F., Petitclearc T., *Biophysique*, (1982), Ed. F. Gremy, Flammarion
4. Baran D., Topoliceanu F.,(1999) : Cell and tissue peculiarities of microvascular networks, XV^{eme} Session des Journées Médicales Balkaniques , Programme,nr.49.
5. Baran D., Munteanu F., Corciova C., (1999): Cytohistologic patterns of arthropathic diarthrodial joint involvement, , XV^{eme} Session des Journées Médicales Balkaniques ,Programme,nr.10.
6. Benga Gh., *Biologia membranelor și aplicații medicale*, (1976), Ed. Dacia, Cluj Napoca
7. Berredge M., (1985), The molecular basis of communications within the cell, *Scientific American*, 253(4): 142-150
8. Best R., Taylor K., *Bazele fiziologice ale practicii medicale*, (1984), Ed. Medicală, Bucuresti
9. Cernea P., Constantin F., *Vederea culorilor*, (1977), Ed. Scrisul românesc, Craiova
10. Chabre M., (1985), From the Photon to the Neuronal Signal, *Europhysics News*, 16, 5:1-5.
11. Cosens D., LeBlanc N., (1980), Frequency dependent flicker response enhancement in the lamina ganglionaris of *Drosophila*, *J. Comp. Physiol.*, 137: 341-351
12. Creangă D.E., Isac M., Isac R.M., Ursu D., (1997), The light beam wavelength and flashing frequency influence on the fly electroretinogram, *Physiology*, (Official J. of the Rom. Soc. of Physiol. Sci.), 7, 2 (14):31-36
13. Creangă D.E., (1997), The blue light effect on the eye sensitivity, *Balkan Physics Letters*, 5: 1936-1940
14. Creangă D.E., (1999), A semi-quantitative insight in the visual system dynamics, acceptată pentru comunicare la 11th, NBCBE99, *Medical & Biological Engineering & Computing* , 37, 1,345-357

15. Creangă D.E., Cernea M., Băra I.I., Tufescu Fl. M., (1996), The influence of the microwave treatment on some phenotypical parameters of *Secale cereale* L., Rev. Roum. de Biol., 41, 1, 45-51
16. Creangă D.E., Isac M., Isac R.M., (1997), Selective interaction model and photoreceptor cell membrane, J. of Biol. Phys., Olanda, 23, 143-149
17. Creanga D.E., Isac M., Isac R.M., Ursu D., (1997), Fly eye phototransduction for different lighting parameters, în Abstract book of the 11th Balkan Biochemical Biophysical Days, Thessaloniki, Greece, 62
18. Creangă D.E., Isac. M, Isac, R.M., (1997), Molecular phenomena induced by light action on visual cell membranes-mathematical modeling, Roum. J. of Optoelectronics, 5, 2: 164-168
19. Creangă D.E., Morariu V. V., Isac R.M., Ursu, D., (1998), Quasi-nullgeomagnetic field influence on the eye bioelectrogenesis, EMMA98 Conference, Zaragoza, Spania, Abstract book, 101
20. Creangă D.E., Sprott J.C, Ursu D., Isac R.M., (1998), A complexity analysis upon the sensitivity of the fly visual system to the light intensity, Int. J. of Chaos Theor. and Appl., Laussane, Elveția, Vol.3, No.3, 21-33
21. Creangă D.E., Stan C., Isac M., Isac R.M., (1997), Some quantitative aspects concerning bioelectrogenesis in *Drosophila melanogaster* eye, Physica Medica, XIII, 1, 86-87
22. Creangă D.E., Tufescu Fl.M., Cernea M., Băra I.I., (1995), Some quantitative aspects concerning the low intensity microwave influence on the *Secale cereale* L. individuals, Rom. J. of Biophys., 5, 2-3, 153-159
23. Crețeanu G., Haulică I., Topoliceanu F., Riegler B., Petrescu G. (1968): Cercetări privind influența Riboflavinei asupra transportului activ de ion. Rev. Med. Chir., nr.1, p.91
24. Cruce M.,Cruce R.,Zaharia B., Simionescu D.,Simionescu A., Deac R.(1997):Adeziunea celulară și matricea extracelulară.Editura Aius,Craiova
25. Darnell J., Lodish H., Baltimore D., (1990), Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York, 7
26. Denischi A., Marin I.Gh., Antoniescu D., Petrescu R., (1989), Biomecanica, Ed.Acad. R.S.R.
27. Dimoftache C., Herman S., (1993), Biofizica medicală, Ed, Cerma, București,
28. Edman K.A.P.,(1975):Mechanical deactivation induced by active shortening in isolated muscle fibres of the frog.J.Physiol.(London) 246:255-275

29. Fung Y.C., (1981), Biomechanics-Mechanical Properties of Living Tissues, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
30. Gheorghe V., Popescu A., (1990), Introducere în bionică, Ed. Științifică, București
31. Grémy F., Perrin J., (1975), Elements de Biophysique, Ed. Flammarion, Paris
32. Grémy F., (1982), Biophysics, Ed, Flammarion, Paris
33. Hardie R., Vogt K., Rudolph A., Laughlin S.B., Stavenga D.G., (1989), The compound eye of the tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans* and *Glossina palpalis palpalis*), J. Insect. Physiol., 35, 5: 423-431
34. Hardie R.C., Peretz A., Suss-Toby E., Rom-Glass A., Bishop S.A., Selinger Z., Minke B., (1993), Protein kinase C is required for light adaptation in *Drosophila* photoreceptors, Nature, 363: 634-637
35. Hardie R.C., (1984), Properties of photoreceptors R7 and R8 in dorsal marginal ommatidia in the compound eyes of *Musca* and *Calliphora*, J. Comp. Physiol. A., 154: 157-165,
36. Hardie R.C., (1986), The photoreceptor array of the dipteran retina, Trends in Neurosciences, 9: 419-423
37. Hardie R.C., (1995), Photolysis of caged Ca^{2+} facilitates and inactivates but does not directly excite light sensitive channels in *Drosophila* photoreceptors, J. of Neurosciences, 15, 1: 889-902
38. Hardie R.C., Minke B., (1995), Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca^{2+} and trp, Cell calcium, 18: 256-274
39. Hardie R.C., Peretz A., Suss-Toby E., Rom-Glass A., Bishop S.A., Selinger Z., Minke B., (1993), Protein kinase C is required for light adaptation in *Drosophila* photoreceptors, Nature, 363: 634-637
40. Hardie R.C., Stavenga K., (1989), Facets of vision, Springer Verlag, Berlin
41. Haulică I., Avram M., Stefan I., Topoliceanu F., Buznea R., Branișteanu D. (1968) : Cercetări privind influența hipobarismului asupra reacțiilor de adaptare la effort. Rev. Med. Chir., nr.4, p.945.
42. Haulică I., Topoliceanu F., Haulică A., Ciurea E. (1968) : Comparative study of the effects of Carnosine and Homocarnosine on the transport of active ions. Symposium on Biophysical Aspect of Permeability, Jerusalem, (abstract) .
43. Haulică I., Topoliceanu F. și col., (1989): Influența captoriului asupra circulației coronariene , studiu clinico-experimental. Rev. Med. Chir. Iași, vol. 93,4,741 – 746.
44. Haulică I., Branișteanu D., Petrescu G., Rusu V., Neamțu C., Topoliceanu F., Petrescu Z., Slătineanu S., Stratone A., Carasievici

- use during a supramaximal isokinetic muscle contraction, J.of Biomechanics, 31, 105.
85. Mărgineanu, D.G., Isac M., Tarba, C., (1980), Biofizica, Ed. Did. și Ped., București
 86. Neamțu, S., Tamaș, V., (1986), Pigmenți carotenoidici și metaboliți, Ed. Ceres, București
 87. Nicolau, Cl., Simon, Z., (1967), Biofizica moleculară, Ed. Științifică, București
 88. Pavel, A., Vlahovici, Al., Trifan, M., Băra I. I., Creangă, D.E., (1999), Influența lichidelor magnetice asupra unor specii de plante de interes farmaceutic, Rev. Med.Chirurg., 3-4, 67-73.
 89. Petrescu O., Baran T., Topoliceanu F. și Herșcovici H. (1974): Cercetări "in vitro" privind mecanismele de transport al iodurii în celulele tiroidiene. Simpozin Național de Biofizică, Tg.Mureș, (abstract).
 90. Popescu A., (1994), Fundamentele biofizicii medicale, Ed. ALL, Bucuresti
 91. Popescu, A.I., (1997), Biofizică moleculară și supramoleculară, Ed. ALL, Buucurești
 92. Porumb, T., (1985), Biofizica moleculară, Ed. Dacia, Cluj Napoca.
 93. Radu H.,(1978) : Patologia unității motorii, Editura Medicală, București
 94. Rasmussen, H., (1989), The cycling of calcium as an intracellular messsanger, Scientific American, 261(4): 66-73
 95. Rosen, O.M., (1987), After insulin binds, Science, 237:1452-1458
 96. Ruck, P., (1961), Electrophysiology of the insect dorsal ocellus III, J. Gen. Physiol., 44: 644-657, citat de de Cosens, D., Le Blanc N., (1980) în: Frequency dependent flicker response enhancement in the lâmina ganglionaris of *Drosophila*, J. Comp. Physiol., 137: 341-351
 97. Rush, K., Fulton, J., (1970), Fiziologie medicală si biofizică, Ed. Medicală, Bucuresti
 98. Rusu, V., Baran, T., Brănișteanu, D.D., (1988), Biomembrane și patologie, Ed. medicală, București
 99. Rüegg J. C., (1988), Calcium in Muscle Activation, Ed. Springer Verlag
 100. Speck T., Mutz M., Ohl. S., Spatz , H.Ch., (1984), The electroretinogram of *Drosophila* to flickering light: the assesment of the contributions of receptor cells R7 and R8, J. Insect. Physiol., 30, 6: 437-440
 101. Sprang S.R., Acharya K.R., Goldsmith E.J., Stuart D.I., Varvill K., Fletterick R.J., Madsen N.B., Johnson L.H., (1988), Structural

114. Topoliceanu F. și Haulică I. (1971): Unele relații dintre Angiotensină, 3'5 AMP și transportul transepitelial de Na. Internat. Conf. Physiol. and Pharmac. Of cyclic AMP, Milano, (abstract).
115. Topoliceanu F. Haulică I. și col., (1972) : Comparative study on Epsilonaminohexanoic acid (EAH) and Strophantine effects on the sodium transepitelial transfer. IV-lea Congres Internațional de Biofizică, Moscova, (abstract)
116. Topoliceanu F., Haulică I. și col., (1984): Contributions a l'étude du phenomene myotonique realise experimentalement avec du 2,4-D chez le rat. 52eme Reunion de l'Association des Physiologistes, Bruxelles, p.203 (abstract)
117. Topoliceanu F., Haulică I. și col., (1984): La valeur experimentale de la vessie urinaire de batracien dans l'étude de l'electrogenese spontanee du muscle lisse . 52eme Reunion de l'Association des Physiologistes, Bruxelles, p.205 (abstract).
118. Topoliceanu F. și col., (1985): Cercetări privind modularea adrenergică a transportului de sodiu activ transepitelial. Conferința Națională de Biofizică, Iași, p.101 (abstract)
119. Topoliceanu F., Haulică I. și col., (1985): L'utilisation de la vessie urinaire de batracien en tant que modele experimental dans l'étude de l'electrogenese spontanee de type "pace-maker". Journees Franco-Roumaines de Biophysique Cellulaire et Medicine Nucleaire, Iași, vol. III, p.53, (abstract).
120. Topoliceanu F., Haulică I. și col., (1987): Cercetări electrofiziologice și de microscopie electronică privind activitatea electrocontractilă a vezicii urinare de batracian. Bull. Soc. Naționale de Biologie Celulară, p.80, (abstract).
121. Zaharia D., Varvara G. și Topoliceanu F. (1998) : Frequency analysis of a microvascular resistance model depending on chaotic vasomotion. Proceeding of Medical Sciences Simulation Conference San Diego, 174 - 177 .
122. Vasilescu V., (1977), Biofizica medicală, Ed. Did. și Ped., București
123. Wallis, D.I., ed., (1993), Electrophysiology-a practical approach, Oxford University Press.
124. Warren T., (1995): Carbohydrate bioengineering, Edited by Petersen S.B., Svensson B., Pedersen S., Elsevier Science , vol.13, 447 - 450.

Autori:

Conf.univ.dr. Rodica Maria Isac

Disciplina de Biofizică medicală
Facultatea de Bioinginerie medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie
"Gr.T.Popa" Iași

Prof.univ.dr. Florin Topoliceanu

Decanul Facultății de Bioinginerie medicală
Disciplina de Explorări funcționale
Facultatea de Bioinginerie medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie
"Gr.T.Popa" Iași

Șef lucr.dr. Dorina Emilia Creangă

Disciplina de Biofizică
Facultatea de Fizică
Universitatea "Al.I.Cuza" Iași

Referenți științifici:

Prof.univ.dr. Valeriu Rusu

Decanul Facultății de Medicină Generală
Titularul Catedrei de Biofizică medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie
"Gr.T.Popa" Iași

Prof.univ.dr. Ioan Grosu

Titularul Catedrei de Fizică medicală
Facultatea de Bioinginerie medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie
"Gr.T.Popa" Iași



ISBN 973 – 9333 – 38 – 9

EDITURA APOLLONIA

Iași - România

Bun de tipar: 25-01-2002

Tiraj: 200 exemplare;

Hârtie tipar tip offset 60g/1m²;

Format bobine de 61 cm lățime;

Tipar executat la:

S.C. ALPHA CENTAUR S.R.L.

Strada Uzinei, nr.59, Telefon 218380

*"Functions must be understood in term of structures,
Structures must be understood in term of chemistry."*

George Emil PALADE
NOBEL PREIS – 1974

*Sperăm ca efortul nostru, concretizat în editarea
unui prim volum din ciclul dedicat problemelor
actuale ale disciplinelor de graniță biomedicale și
tehnico-medicale, să reprezinte un început în formarea
complexă, bio- și tehnico-medicală, a viitorilor specialiști
în profesiunea de bioinginer medical.*

Autorii

ISBN 973-93333-38-9

Tipar executat la S.C. ALPHA CENTAUR S.R.L.
str. Uzinei nr. 59, Iași, tel. 032-218380

